

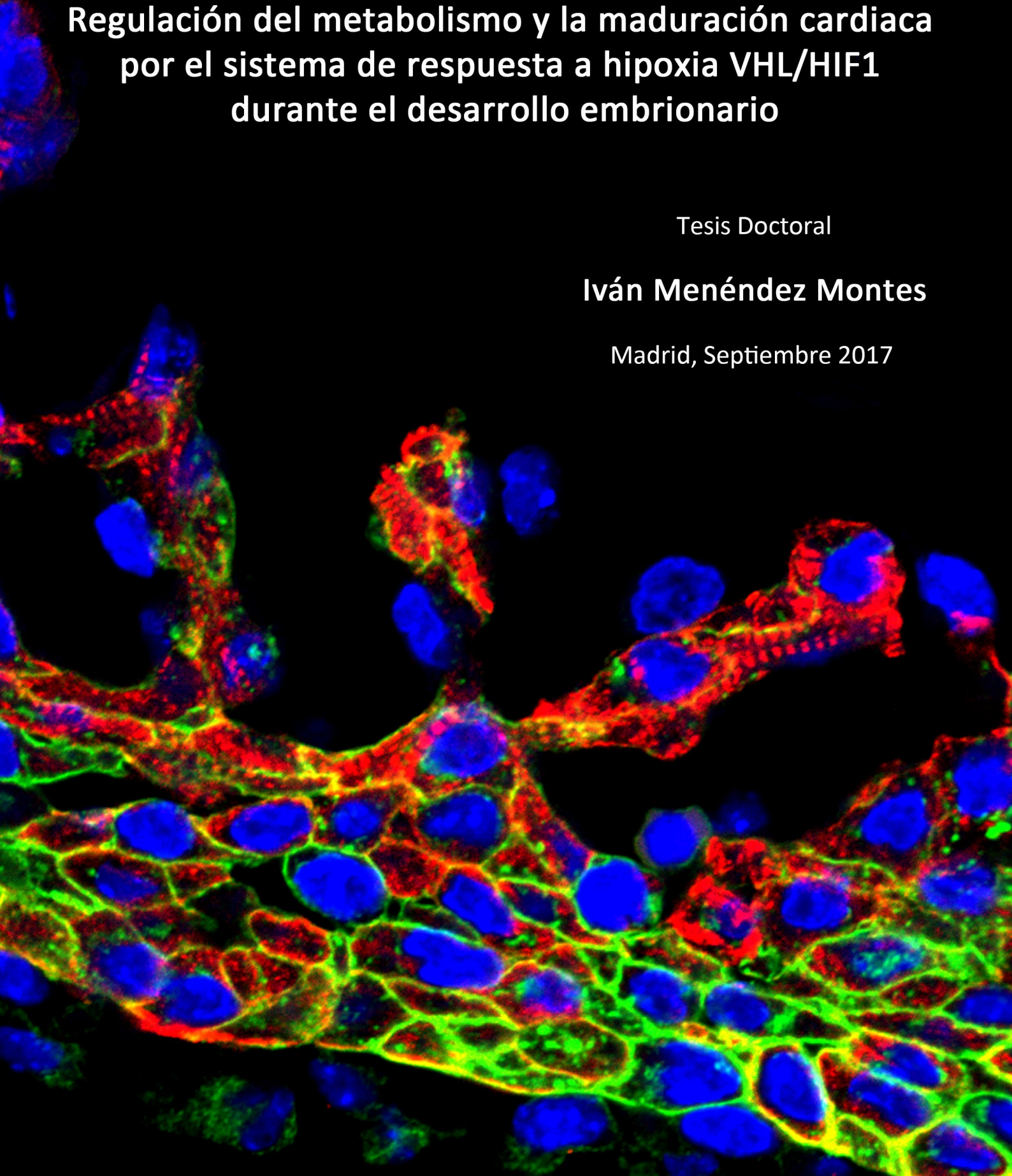
Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Regulación del metabolismo y la maduración cardíaca por el sistema de respuesta a hipoxia VHL/HIF1 durante el desarrollo embrionario

Tesis Doctoral

Iván Menéndez Montes

Madrid, Septiembre 2017



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Regulación del metabolismo y la maduración cardiaca
por el sistema de respuesta a hipoxia VHL/HIF1
durante el desarrollo embrionario**

Tesis Doctoral

Iván Menéndez Montes

Madrid, Septiembre 2017

Directora: Dra. Silvia Martín Puig

A Mamá y Papá, que empezaron todo esto

“Toda la vida he tenido un sueño: conseguir todos mis objetivos”
Homer J Simpson – Personaje de dibujos

*“El genio es un uno por ciento de inspiración,
y un noventa y nueve por ciento de transpiración”*
Thomas Alva Edison – Inventor estadounidense

“Ninguna de las cosas que valen la pena en esta vida son fáciles”
Nicholas Sparks – Escritor estadounidense



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



cnic

Este trabajo ha sido llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Silvia Martín Puig, en el Área de Biología Celular y del Desarrollo del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en Madrid (España).

Este estudio ha sido financiado por los proyectos SAF2011-29830 del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, FP7-PEOPLE-2010-RG-276891 de la Comisión Europea y ConSEPOC-CM/S2010/BMD-2542 de la Comunidad de Madrid/Fondos FEDER europeos. Además, el grupo ha sido beneficiario de fondos procedentes de la acción COST TD0901 para la asistencia a congresos y eventos del programa “Hypoxianet”.

Iván Menéndez Montes ha sido beneficiario de una beca “La Caixa-CNIC Severo Ochoa” de la Fundación Obra Social La Caixa para la realización de la Tesis Doctoral y de una beca EMBO Short-Term Fellowship para la realización de una estancia formativa en el laboratorio del Dr. Hesham Sadek, en la UT Southwestern Medical Center en Dallas (EEUU).

AGRADECIMIENTOS

Tras 5 años trabajando en el CNIC, he reunido una colección enorme de momentos vividos, recuerdos compartidos y muchas cosas que agradecer. Por supuesto, también ha habido momentos duros, como en todo en la vida. Parece que en toda despedida tendemos a acordarnos sólo de los buenos momentos. Sin embargo, creo que eso es un error. Los momentos duros son igual de valiosos: nos enseñan a ser más fuertes, a superar dificultades, a madurar y a sacar recursos de nosotros mismos que no sabemos que tenemos. También ponen de manifiesto todo el cariño y el amor que nos dan las personas que tenemos alrededor. Es muy fácil estar ahí en las risas, las copas y los buenos momentos, pero es en los momentos no tan buenos cuando descubres que hay mucha gente cuidándote (y todo aquél que haya pasado por un doctorado sabrá que no sólo hay color rosa). Dicho esto, dejemos de lado los dramas y vayamos a lo que probablemente sea lo más leído de una Tesis Doctoral: los agradecimientos.

Agradecer, en primer lugar, a la Dra. Silvia Martín por haberme dado la oportunidad de formar parte de este equipo y de desarrollar todo este trabajo. Han sido 5 años intensos y las circunstancias no siempre han estado de nuestro lado, pero, pese a todo, hemos sobrevivido. Contigo he aprendido grandes lecciones que me acompañarán toda la vida. Gracias por tu dirección, por tus consejos, por revisarte todas las páginas que siguen a continuación, por tu especial atención a todos los detalles y por enseñarme que nunca hay que dejar de cuestionar lo que se tiene por cierto. Aunque esto suene a despedida, espero que sea un “hasta luego” y que volvamos a tener la oportunidad de volver a hacer ciencia de la buena juntos.

Y, hablando del equipo, no existirían agradecimientos sin mencionar a dos personas muy especiales: Bea Escobar y Bea Palacios. Chicas, no hay nada que no os haya dicho ya que no sepáis. A nivel laboral, estoy muy enfadado con vosotras. ¿Dónde voy a encontrar a dos compañeras tan increíbles para trabajar juntos? ¿Qué compañeras aceptan venirse al labo a cenar hamburguesas a las 11 de la noche mientras se procesan muestras, con tal de estar juntos? A nivel personal, me cuesta encontrar palabras. Bea E, tú estabas aquí cuando llegué y enseguida quedó claro que teníamos una conexión especial. Muchas gracias por los paseos a Chamartín, por tu alegría y tus sonrisas, por ese Burger King en tu terraza en nuestras noches de solteros, por tus llamadas, por escuchar, por esos dos soles que has traído al mundo, por ser tú. Bea P, llegaste más tarde pero eso nunca significó nada. Te integraste tan rápido que parece que siempre estuviste ahí. Al igual que “la Bea”, has sido un flechazo. Gracias también a ti por las risas, nuestros bailes de zumba al ritmo del taxi, por las canciones de la Pantoja, por tener esa chispa que alegra el día del todo aquel que está a tu alrededor, por “la Carla” y por esos “Chiquito cabrón”. Chicas, gracias por haber cogido mi mano, por ser tan especiales y por esa amistad que me acompañará para siempre, vaya 3 patas pa’ un banco que nos hemos juntado!! Os quiero.

Y hablando de bancos, falta la cuarta pata. Vane, aunque no hayas sido compañera de pipeta, has sido (y eres) mi gran hermana mayor. Gracias por todo, que es mucho. Gracias por tu calma, por responder esa llamada desde una calle de Salou, por ser tan increíble, por los servicios de marquería a domicilio, por saber cuándo sólo hay que escuchar, por saber cuándo hay que hablar. Si es que sólo viendo a Óscar uno ya ve la increíble persona que eres. Gracias por ser la cuarta esquina del cuadrado, por saber que el “Afuega’l Pitu” es el mejor queso del mundo, por las sidras en Terra Astur a la brisilla gijonesa, por una despedida en el aeropuerto, por haber hecho que los “Chiquitorrrrrrrssss” seamos cuatro. Te quiero.

Gracias también a l@s Torres y exTorres: las Lauras, Cova, Irene, Cris, Susana, Noelia, Sandra, Esther, Jose, Isaac (paquete!!) y Lin. Los de la vieja guardia estabais ahí cuando llegué, me recibisteis con los brazos abiertos y habéis sido unas compañeras estupendas, siempre pendientes, siempre con una palabra amable en la boca. Laura Carramolino, has sido mi mami del CNIC. He aprendido mucho de ti, aunque eso sólo es una pequeña parte de todo lo que sabes, tanto de ciencia como de la vida. Cova, *amore*, las patatas hojaldradas con bacalao por el Puerto de Pajares saben mejor acompañadas al ritmo de Alaska en cualquier bar de Madrid (manda narices que nunca lo hayamos hecho en Asturias, pero ya sabes que Oviedo mola menos); Irene, Campanilla en tu terraza tenía su punto, pero esas gafucas son

lo más. Cris, aunque ahora tengas un acento British de manual, eres mi *veggie* favorita. Marisu, eres la persona más lenta comiendo que conozco (lo siento, tenía que decirlo), lo cual es bueno, porque da más tiempo para estar contigo. Aunque creas que Falete trabajó en seguridad, tienes un corazón que vale más que su peso en oro. Rocío, aunque tú seas de la 1 y yo de las 3, en cualquier otro momento hemos podido hacernos unos corrillos. Me alegro de que fuese una broma, pero me alegro mucho más de que estuvieses dispuesta a dejar al viento dando la vuelta para ir a buscarme a una oscura estación de la sierra. Guigui!! No habrá panda de “guerras” ni macarrones “salidos” que acaben contigo, aunque sabes que no debes fiarte de mí para aprender español. Noelia, espero que alguna cosilla que aprendimos juntos te haya sido de utilidad y que recuerdes con cariño a los locos con los que compartiste ese primer año. Sandra, ¿o debería decir Luci?, pese al silencio de tus inicios, conseguiste subirme a un rocódromo y sigo vivo para contarlo aquí!! No puedo decir lo mismo de esas rondas “pago yo, pagas tú” en las que tan bien nos lo pasamos. Ester, ¿has visto? Ya me he aprendido tu nombre! O era Claudia?

Tampoco puedo olvidarme de los que han pasado por aquí para irse muy cerca o muy lejos. Eliú, con su acho y su casco, Mickaelo, con sus fados y sus “tetonas”. Y, cómo no, mi pequeña Vero. Ha sido un placer trabajar contigo, espero que hayas aprendido algo de mí, al menos un poquito. Echamos mucho de menos tus rizos por aquí y esos abrazos que siempre estás dispuesta a dar y recibir. Eres nuestra pequeña, pero eres muy grande!

Y, hablando de pequeñas... falta Sofía!! Sí, te he dejado para el final porque sé que te estarías preguntando qué voy a decir de ti. Parece mentira que empezásemos con mal pie, mira que eres borde jeje. Y mira ahora! Mi hermanita pequeña, estoy orgulloso de cómo has madurado en estos tres años, de cómo te has adaptado y te has hecho con el control, y no lo tienes fácil. Por tus chaquetas de almirante, por meterte con mis mallas, por las fiestas de Sanse, por la Red Velvet, por meterme caña, por los cigarros al salir y por la “mierda de pavo”. Te quiero chiquitina!

Agradecer también a todos los miembros de la 3ª Norte su compañía y ayuda durante todos estos años. Desde los que ya no estáis hasta los que acabáis de llegar, habéis contribuido a que la música, las risas y el buen ambiente no faltasen en esta, nuestra planta. Mencionar muy especialmente a Patri y los desvaríos en terrazas madrileñas, *Oh My God, I miss you so much here!* y a la supermamá Tania Aguado. También al “equipo Muelle”, Dani y Antonio, la mejor prueba de que los Retreats sirven para unir a la gente. Gracias a ello, añadido dos nombres más a mi lista de buenos amigos. Otro *must* a mencionar es Mari (de la Oliva). Gracias por haberme dado la oportunidad de conocerte y por haber confiado en mí. Haces un trabajo increíble, pero más increíble aún es la persona que hay detrás de la trabajadora. Ese chino de Torrejón será el primero de muchos

Muchas gracias también a todas las personas del CNIC y de fuera que han aportado su granito de arena, a muchos niveles distintos, para que hoy pueda estar escribiendo esto. Gracias a las Dras. Katrien de Bock, Susana Cadenas y Cristina Villa su revisión de esta Tesis. Gracias al Dr. Jesús Borreguero y al Dr. Jesús Ruiz-Cabello, dos ejemplos de amabilidad y disponibilidad. Gracias a los Dres. Julián Aragonés y Miguel Torres por todas sus aportaciones. Gracias a Jose, por hacer que el metabolismo fuese más entendible. Gracias a Ana y Lorena, por su disponibilidad y buen hacer y por las numerosas horas en el VEVO, que han pasado como minutos charlando con vosotras. Gracias a Bea y Ana, que además de ocuparse de que nunca falte una punta, son dos grandes personas. Gracias también a todo el equipo de Formación: a Julia Redondo, por resolver siempre mis (múltiples) dudas, a Susana Negrete, por nuestro clan de las mañanas y su enorme ayuda (te echamos de menos!!) y a Cristina Giménez, por ser la caña. A Ana López, por nuestras charlas y porque le gusta Asturias tanto como a mí. También a Tere y Mari. A Teresa Casaseca, que, aunque nos meta caña, en el fondo nos cuida mucho. A Marta Ramón, por aguantarme cada vez que había que preparar un viaje. A Ángel, Jose y Esther, porque sin su trabajo no podríamos hacer el nuestro. A Edu, por esa masterclass cebril y por ser un gran fan del ponche segoviano. A Danielo y Óscar, por traer aire fresco.

Gracias también a las Unidades. Mencionar especialmente a Elvira, Vero y Antonio, por impedir que arrojara el Nikon por una ventana y por toda su ayuda, incluso fuera de temas “micro”. A Manuel, de Bioinformática, por hacer claro lo que era oscuro. A todo el equipo de Animalario y de Charles River, por su gran trabajo, a veces no tan reconocido, especialmente a Vir, mi gran maestra en el mundo ratonil, a Raquel, por sus risas y su trabajo, a Eva, Alberto y Eu (guapos!!), a Merche y Antonio, por mis peticiones extrañas, a Yoli y su gran paella y a Iria y sus postres. Sin olvidar a Ana Ricote, simplemente por ser Ana Ricote. A Antonio de Molina, Roisin y todos sus chic@s, por su gran trabajo, su amabilidad y disposición. A Paco y Cova (Sidi-UAM), por su gran esfuerzo con las muestras y su gran ayuda en todo.

Como fuera del CNIC también hay mundo, muchas gracias a mi antiguo labo del CBM, especialmente a la Dra. Beatriz López y a Esther Arribas, por hacerme sentir como en mi casa durante un año. Gracias también a los Morfólogos de Oviedo, sobre todo a Marina, que tanto me enseñó en mi primera experiencia en la ciencia, y a las Dras. Ana Coto y Pepa Rodríguez, por hacerme ilusionarme con esta profesión y por ser dos grandísimas personas.

Muchas gracias al Dr. Hesham Sadek, por su acogida en Dallas y por darme una gran oportunidad. Gracias a todos mis compis dalasitas: Jainy, Wataru, Yuji, Diana, Suwannee, Feng, Nhi, Bev, Ingrid, Asitha, Nick, Allisson y Ana. Y cómo no, a Waleed y Abdallah, por cuidarme tanto esos meses, por el Jasmine, por la Kuna y por el backgammon.

Y no podría pasar por Oviedo sin mencionar al grupo de Bioquímicos: Pedro, Pablo, Prieto, Armando, Alejandro, Marta, María D, María S, Natalia y Sonia. Han sido muchas horas juntos, desde el pollo como especie al Risk inmunológico. Y aunque nuestros caminos particulares nos lleven lejos unos de otros, eso sólo hace que los reencuentros serán mucho mejores. Gracias chicos, por ser ese grupo de WhatsApp que nunca se queda sin leer. Gracias a Ana y a Carlos, que aunque sean Bioquímicos, también son los mejores vecinos del mundo. Desde Terrassa o desde Dallas, recordad que siempre nos queda “el Argentino” ☺

Y de Oviedo acabamos en Gijón. Gracias a todo ese gran grupo de gente que hacen que “volver por Navidad” sea especial: A Escu y Jeny por ser tan estelares, a todas las Cukis, por esa locura que tenéis, a Mónica Ujados y su kiwi verde, a Mónica, por tantos años, y a Fran, por cuidarme al enano. A Olaya, Anina y Adri, mi Santísima Trinidad, porque me conocéis mejor que yo mismo. Y, aunque sea madrileño y eso no mole tanto, gracias a Pepe, por ser una gran persona que se ha ganado un gran hueco en muy poco tiempo.

Finalmente, dar las gracias a mi familia. Esos abuelos y tía que esperan la visita del nieto/sobrino y que, aunque no entiendan ni la cuarta parte, escuchan todo, porque para ellos es lo más importante del mundo. Gracias a mi hermano Hugo, probablemente pocos entenderán nuestra relación, pero eres un gran ejemplo a seguir y una fuente de inspiración en muchos aspectos. Gracias a mis padres, Jose y Sonia, por su apoyo, su cariño, sus palabras, sus broncas, por haber sido y seguir siendo los mejores padres. Por su grandísima contribución a mi yo de hoy en día, por ser simplemente “Má” y “Pá”. Gracias a Manoli, la nueva familia, por su cariño incondicional y por hacerme un hueco en su vida. Os quiero mucho a todos.

Y, cómo no, gracias a Gonzalo. Gracias por tu paciencia, tu comprensión, por preocuparte de todas esas cosas de las que yo no me preocupo. Por estar siempre ahí para celebrar mis logros y para llorar mis fracasos. Por ser el mejor compañero de viaje que existe. Por todo lo que ha habido y todo lo que queda por venir. Por un 10 y más. Porque el mundo es física y la física son números: 8568.

Y a aquel o aquella que esté leyendo estas líneas, gracias por haber llegado hasta el final.

GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	23
ABSTRACT	27
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	31
ABREVIATURAS	37
INTRODUCCION	41
1 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CORAZÓN EN RATÓN	43
<u>1.1 Etapas del desarrollo de corazón en ratón</u>	43
1.1.1 <i>Progenitores mesodérmicos y formación del tubo cardiaco</i>	43
1.1.1.A Formación del tubo cardiaco lineal	43
1.1.1.B Adición de progenitores del campo cardiaco secundario	45
1.1.1.C Giro del tubo cardiaco, alineamiento de las cámaras y reactivación de la proliferación	45
1.1.2 <i>Expansión y especificación de las cámaras ventriculares</i>	46
1.1.3 <i>Maduración de las cámaras ventriculares</i>	46
1.1.3.A Formación de las trabéculas	46
1.1.3.B Engrosamiento del miocardio compacto	47
1.1.3.C Formación del Sistema de Conducción ventricular	48
1.1.4 <i>Procesos postnatales de maduración</i>	49
<u>1.2 Progenitores epicárdicos</u>	50
1.2.1 <i>Formación de la vasculatura coronaria</i>	51
2 LA RUTA DE RESPUESTA CELULAR A HIPOXIA	53
<u>2.1 Regulación de los factores HIF</u>	54
<u>2.2 Prolil-hidroxilasas</u>	54
<u>2.3 von Hippel-Lindau</u>	56
<u>2.4 Hipoxia, factores HIF y desarrollo cardiaco</u>	57
2.4.1 <i>Modelos globales de delección</i>	57
2.4.1.A Modelos de delección global de <i>Hif1a</i>	57
2.4.1.B Modelos de delección global de <i>Hif1b</i>	58
2.4.1.C Modelos de delección global de <i>Hif2a</i>	58
2.4.1.D Modelos de delección global de <i>Vhl</i>	58
2.4.2 <i>Modelos condicionales cardiacos de delección</i>	59
2.4.2.A Modelos condicionales cardiacos de <i>Hif1a</i>	59

2.4.2.B Modelos condicionales cardiacos de <i>Vhl</i>	60
3 METABOLISMO CARDIACO	61
<u>3.1 Sustratos metabólicos en el corazón</u>	61
3.1.1 <i>Ácidos grasos</i>	61
3.1.1.A Regulación del metabolismo de ácidos grasos.....	62
3.1.2 <i>Glucosa</i>	62
3.1.2.A Entrada de piruvato en la mitocondria	62
3.1.2.B Conversión de piruvato en lactato	62
3.1.2.C Rutas anapleróticas del piruvato.....	63
3.1.3 <i>Aminoácidos</i>	64
<u>3.2 Metabolismo y desarrollo embrionario</u>	65
3.2.1 <i>Metabolismo en el corazón embrionario</i>	65
<u>3.3 Factores HIF y regulación del metabolismo</u>	66
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1 MODELOS ANIMALES	73
<u>1.1 Líneas de animales transgénicos y condiciones de estabulación</u>	73
<u>1.2 Genotipado</u>	73
<u>1.3 Inoculación de sustancias: pimonidazol y BrdU</u>	75
1.3.1 <i>Inoculación de pimonidazol</i>	75
1.3.2 <i>Inoculación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)</i>	75
2 EXTRACCIÓN Y PROCESADO DE EMBRIONES Y TEJIDOS	75
<u>2.1 Extracción de embriones</u>	75
2.1.1 <i>Procesamiento de embriones para técnicas histológicas en parafina</i>	76
2.1.2 <i>Procesamiento de embriones para criosecciones frescas</i>	76
2.1.3 <i>Procesamiento de embriones para técnicas de bioquímica y biología molecular</i>	76
<u>2.2 Extracción de corazón de ratón adulto</u>	76
2.2.1 <i>Procesamiento de corazones para técnicas histológicas en parafina</i>	77
2.2.2 <i>Procesamiento de corazones para técnicas de bioquímica y biología molecular</i>	77
<u>2.3 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica</u>	77
3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	77

3.1 Tinción hematoxilina-eosina	77
3.2 Tinción Tricrómico de Masson	78
3.3 Hibridación <i>in situ</i>	78
3.4 Inmunofluorescencia.....	79
3.5 Inmunohistoquímica	80
4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	80
4.1 Extracción de ARN de corazón embrionario	80
4.2 Obtención de ADN codificante mediante reacción de retrotranscripción	81
4.3 PCR cuantitativa	81
4.4 Síntesis de sondas de ARN para hibridación <i>in situ</i>	83
5 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	85
5.1 Extracción de proteína de corazón embrionario	85
5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección	85
5.3 Detección de actividad COX4 sobre cortes frescos.....	86
6 SECUENCIACIÓN MASIVA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	87
6.1 Preparación de la muestra, creación de librerías y secuenciación	87
6.2 Análisis bioinformático.....	87
6.2.1 Análisis de genes diferencialmente expresados.....	87
6.2.2 Análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes.....	88
7 OTRAS TÉCNICAS.....	88
7.1 Espectroscopia por resonancia magnética nuclear	88
7.2 Ecocardiografía.....	89
7.3 Tratamientos de hipoxia <i>in vivo</i>	89
7.4 Microdissección por captura por láser	89
8 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	90
8.1. Cuantificación de parámetros morfológicos de corazones embrionarios	90
8.2 Cuantificación del área trabecular	90
8.3 Cuantificación de estructuras discretas y relativización	90
8.3.1 Cuantificación de secciones teñidas mediante inmunofluorescencia.....	90
8.3.1.A Cuantificación del área de cardiomiocitos mediante tinción con aglutinina	90
8.3.1.B Cuantificación de la proporción de núcleos positivos.....	90

8.3.2 Cuantificación de secciones teñidas mediante inmunohistoquímica.....	91
8.3.3 Cuantificación de imágenes de microscopía electrónica	91
8.4 Cuantificación de intensidad de bandas de Western-Blot.....	91
9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA.....	92
RESULTADOS	93
1 DISTRIBUCIÓN DE HIF1α EN EL CORAZÓN EMBRIONARIO.....	95
1.1 Compartimentos metabólicos en el corazón embrionario	96
2 DELECIÓN DE <i>Vhl</i> EN PROGENITORES CARDIACOS NKX2.5	98
2.1 Caracterización fenotípica de los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	99
2.1.1 Análisis de los efectos de la delección de <i>Vhl</i> a nivel de progenitores cardiacos	103
2.1.2 Análisis del desarrollo de la vasculatura coronaria en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	104
2.1.3 Análisis del tamaño de los cardiomiocitos en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	104
2.1.4 Delección específica de <i>Vhl</i> en cardiomiocitos: <i>TnTc-Cre</i>	105
2.2 Análisis de la expresión génica en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	107
2.3 Análisis de la proliferación en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	108
2.4 Análisis metabólico de los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	110
2.4.1 Alteraciones en el metabolismo de la glucosa en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	111
2.4.2 Alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	114
2.4.3 Alteraciones mitocondriales en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	116
2.5 Efecto de la delección de <i>Vhl</i> en la función cardiaca del corazón embrionario	120
2.5.1 Alteraciones en el establecimiento del Sistema de Conducción en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	122
2.6 Efectos de la doble delección <i>Hif1a/Vhl</i> en etapas tardías del desarrollo	125
3 DELECIÓN DE <i>Hif1a</i> EN PROGENITORES CARDIACOS NKX2.5.....	128
3.1 Fenotipo de los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	130
3.1.1 Análisis del desarrollo de la vasculatura coronaria en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	132
3.1.2 Delección específica de <i>Hif1a</i> en cardiomiocitos: <i>TnTc-Cre</i>	132
3.2 Análisis de la proliferación en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	133

<u>3.3 Análisis de la formación del Sistema de Conducción en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i></u>	134
<u>3.4 Análisis de la expresión génica en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i></u>	135
<u>3.5 Análisis metabólico de los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i></u>	136
3.5.1 Análisis del metabolismo de la glucosa en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	136
3.5.2 Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	138
3.5.3 Alteraciones mitocondriales en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	140
3.5.4 Adaptaciones metabólicas en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	142
<u>3.6 Análisis de la estructura y la función cardíaca en mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> adultos</u>	146
DISCUSIÓN	149
1 DISTRIBUCIÓN DE HIF1α EN EL CORAZÓN EMBRIONARIO	151
2 INTEGRACIÓN CON MODELOS PREVIOS DE DELECCIÓN CARDIACA	154
3 SEÑALIZACIÓN POR HIF1α, METABOLISMO Y PROLIFERACIÓN	155
4 ADAPTACIONES MITOCONDRIALES A LA SEÑALIZACIÓN ALTERADA DE HIF1	157
5 SEÑALIZACIÓN POR HIF1α/VHL Y EL SISTEMA DE CONDUCCIÓN VENTRICULAR	160
6 FUNCIONES DE VHL INDEPENDIENTES DE HIF1α Y PAPEL DE HIF2α	163
7 ADAPTACIONES METABÓLICAS TRAS LA PÉRDIDA DE HIF1α	165
8 MODELO PROPUESTO	167
CONCLUSIONES	171
CONCLUSIONS	175
BIBLIOGRAFÍA	179

RESUMEN

El desarrollo y maduración cardiacos son procesos complejos que incluyen cambios en el metabolismo de los cardiomiocitos para asegurar la producción suficiente de ATP requerida para una contracción eficaz tras el nacimiento. Se ha descrito anteriormente que la formación del corazón transcurre a bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) y que los Factores Inducibles por Hipoxia (HIFs) juegan un papel importante en el desarrollo del sistema cardiovascular. Sin embargo, existe gran controversia en el campo sobre los procesos de la cardiogénesis regulados por hipoxia y se desconocen los mecanismos moleculares que conectan la señalización de HIF con la correcta formación y función cardíaca.

En esta Tesis Doctoral se ha determinado que existe una distribución dinámica y heterogénea de la subunidad alfa de HIF1 en el miocardio embrionario, que se correlaciona con diferentes programas metabólicos. En etapas tempranas del desarrollo existe una expresión homogénea de HIF1 α en todo el miocardio, que progresivamente se va restringiendo al miocardio compacto (MC) y queda prácticamente excluida de las trabéculas en etapas centrales de la cardiogénesis (E12.5). Esta heterogeneidad en la distribución de HIF1 α está asociada al establecimiento de dos compartimentos metabólicos, con un programa glucolítico en el MC frente a un enriquecimiento en el contenido y actividad mitocondrial en las trabéculas. A E14.5 los niveles de HIF1 α se reducen dramáticamente en el MC coincidiendo con un cambio en el programa metabólico del mismo, que pasa de glucolítico a oxidativo.

La delección de *Vhl*, principal regulador negativo de la ruta de hipoxia, en progenitores cardiacos NKX2.5⁺ previene la bajada en los niveles de HIF1 α en el MC y resulta en su expresión ectópica en las trabéculas, causando la pérdida de los compartimentos metabólicos, un incremento del programa glucolítico y una marcada disminución del contenido y actividad mitocondrial. Estas alteraciones metabólicas están asociadas a un severo adelgazamiento del MC, expresión reducida de genes de contracción y conducción y disfunción cardíaca. Además, la delección simultánea de *Hif1a* y *Vhl* rescata el fenotipo metabólico y los defectos estructurales observados en el mutante simple de *Vhl*, pero no la letalidad embrionaria, apuntando a nuevas funciones de VHL independientes de HIF1 durante la cardiogénesis. Por otro lado, los mutantes simples para *Hif1a* en progenitores NKX2.5⁺ sufren una patente inhibición de la vía glucolítica, pero presentan adaptaciones metabólicas que incluyen un desarrollo precoz de la red mitocondrial a E12.5 y cambios de expresión génica compatibles con un incremento en el catabolismo de aminoácidos, siendo viables y no mostrando alteraciones morfológicas ni funcionales del corazón.

En conjunto, estos resultados revelan una nueva conexión entre el metabolismo y la maduración de los cardiomiocitos y establecen la importancia del eje VHL/HIF en la regulación de la bioenergética cardíaca durante la formación del corazón de mamíferos.

ABSTRACT

Cardiac development and maturation are complex processes that include changes in the metabolism of cardiomyocytes to ensure sufficient production of ATP required for effective contraction after birth. It has been previously described that heart formation occurs at low oxygen concentrations (hypoxia) and that Hypoxia Inducible Factors (HIFs) play an important role in the development of the cardiovascular system. However, there is considerable controversy in the field about the processes of cardiogenesis regulated by hypoxia and the molecular mechanisms that link HIF signaling with proper cardiac function and formation are unknown.

In this Doctoral Thesis it has been determined that there is a dynamic and heterogeneous distribution of the alpha subunit of HIF1 in the embryonic myocardium that correlates with different metabolic programs. In the early stages of development, there is a homogeneous expression of HIF1 α throughout the myocardium, progressively restricted to compact myocardium (CM) and virtually excluded from trabeculae in central stages of cardiogenesis (E12.5). This heterogeneity in the distribution of HIF1 α is associated with the establishment of two metabolic compartments, with a glycolytic program in the CM, against an enrichment in the mitochondrial content and activity in the trabeculae. At E14.5 the levels of HIF1 α are reduced dramatically in the CM coinciding with a change in its metabolic program, which shift from glycolytic to oxidative.

Deletion of *Vhl*, the main negative regulator of the hypoxia pathway, in NKX2.5⁺ progenitors prevents the reduction of HIF1 levels in the CM and results in its ectopic expression in the trabeculae, causing loss of metabolic compartments, an increase in the glycolytic program and a marked decrease in mitochondrial content and activity. These metabolic alterations are associated with severe thinning of the CM, reduced expression of contraction and conduction genes and cardiac dysfunction. In addition, the simultaneous deletion of *Hif1a* and *Vhl* rescues the metabolic phenotype and structural defects observed in the simple *Vhl* mutant, but not embryonic lethality, suggesting new VHL functions independent of HIF1 during cardiogenesis. On the other hand, the simple mutants for *Hif1a* in NKX2.5⁺ progenitors undergo a clear inhibition of the glycolytic pathway, but display metabolic adaptations that include an early development of the mitochondrial network by E12.5, and changes on gene expression compatible with an increased catabolism of amino acids, being viable and showing no morphological or functional alterations of the heart.

Taken together, these results reveal a new connection between metabolism and maturation of cardiomyocytes and uncover the importance of the VHL/HIF axis in the regulation of cardiac bioenergetics during mammalian heart formation.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Listado de figuras

Figura 1	Representación esquemática del desarrollo embrionario del corazón.....	44
Figura 2	Campos cardiacos y compartimentos anatómicos del corazón en desarrollo	45
Figura 3	Desarrollo del epicardio.....	51
Figura 4	Estructura y regulación de los factores HIF	55
Figura 5	Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos ...	63
Figura 6	Vías anapleróticas de los aminoácidos	64
Figura 7	Distribución de HIF1 α en el corazón embrionario.....	95
Figura 8	Compartimentos glucolíticos en el corazón embrionario entre E9.5 y E14.5	96
Figura 9	Compartimentos mitocondriales en el corazón embrionario	97
Figura 10	Deleción de <i>Vhl</i> en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos.....	99
Figura 11	Análisis histológico de los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i> a E12.5	100
Figura 12	Análisis histológico de los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i> a E14.5	101
Figura 13	Efectos cardiacos de la exposición a hipoxia durante la gestación	102
Figura 14	Doble deleción de <i>Hif1a</i> y <i>Vhl</i> en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos	103
Figura 15	Caracterización de los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i> a E10.5	104
Figura 16	Alteraciones coronarias en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i> a E14.5	105
Figura 17	Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i> a E14.5	105
Figura 18	Análisis histológico de los mutantes <i>Vhl/TnTc</i> a E14.5.....	106
Figura 19	Alteraciones coronarias en los mutantes <i>Vhl/TnTc</i> a E14.5	107
Figura 20	Análisis de términos de Ontología Génica en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	108
Figura 21	Alteraciones en proliferación en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	109
Figura 22	Alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	110
Figura 23	Perfil metabólico en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	111
Figura 24	Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	112

Figura 25	Alteraciones en el metabolismo glucolítico tras exposición a hipoxia y en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i>	113
Figura 26	Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	114
Figura 27	Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i>	115
Figura 28	Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	116
Figura 29	Alteraciones en la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	118
Figura 30	Procesos de autofagia y mitofagia en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	119
Figura 31	Análisis de la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i> ...	120
Figura 32	Análisis de la función cardíaca en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	121
Figura 33	Análisis de la función cardíaca en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i>	122
Figura 34	Alteraciones en la expresión de genes relacionados con conducción y contractilidad en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	123
Figura 35	Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	124
Figura 36	Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i>	125
Figura 37	Análisis histológico de los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i> a E17.5	126
Figura 38	Alteraciones coronarias en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i> a E17.5.....	127
Figura 39	Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes <i>Hif1a/Vhl/Nkx2.5</i> a E17.5	127
Figura 40	Deleción de <i>Hif1a</i> en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos	129
Figura 41	Análisis histológico de los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E14.5.....	130
Figura 42	Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E14.5.....	131
Figura 43	Análisis de la identidad del miocardio compacto en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	131
Figura 44	Alteraciones coronarias en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E14.5	132
Figura 45	Análisis histológico de los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E14.5.....	133
Figura 46	Análisis de la proliferación en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	134

Figura 47	Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	135
Figura 48	Análisis de términos de Ontología Génica en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	136
Figura 49	Alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	136
Figura 50	Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	137
Figura 51	Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes <i>Hif1a/TnTc</i>	138
Figura 52	Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	139
Figura 53	Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E14.5 ...	140
Figura 54	Alteraciones en la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> ..	141
Figura 55	Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E12.5 ...	142
Figura 56	Análisis de expresión de genes de transporte y metabolismo de aminoácidos en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	143
Figura 57	Análisis metabolómico en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E12.5	144
Figura 58	Análisis de la ruta de mTOR en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a E12.5	145
Figura 59	Análisis de la autofagia en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	146
Figura 60	Análisis histológico de los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i> a 5 meses de edad.....	146
Figura 61	Análisis de la función cardíaca en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	147
Figura 62	Análisis de la función diastólica y del electrocardiograma en los mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	148
Figura 63	Distribución y expresión de HIF1 α en el gradiente de oxígeno	153
Figura 64	Modelo propuesto del papel de HIF1 α en el corazón en desarrollo	169

Listado de tablas

Tabla 1	Genotipado de las líneas de ratón empleadas	74
Tabla 2	Composición de las soluciones empleadas en la hibridación <i>in situ</i>	78
Tabla 3	Anticuerpos primarios empleados y condiciones de uso	80
Tabla 4	Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR cuantitativa.....	81
Tabla 5	Oligonucleótidos empleados en la síntesis de sondas para hibridación <i>in situ</i>	84
Tabla 6	Composición de los geles de Western-Blot	85
Tabla 7	Anticuerpos primarios empleados en el análisis por Western-Blot	86
Tabla 8	Análisis de recuperación de mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	101
Tabla 9	Análisis de recuperación de mutantes <i>Vhl/TnTc</i>	106
Tabla 10	Muestras empleadas en el análisis de RNASeq de mutantes <i>Vhl/Nkx2.5</i>	108
Tabla 11	Muestras empleadas en el análisis de RNASeq de mutantes <i>Hif1a/Nkx2.5</i>	135

ABREVIATURAS

Durante la escritura de esta Tesis Doctoral se han referido los símbolos de los genes en cursiva con la primera letra en mayúsculas y los símbolos de las proteínas sin cursiva y en mayúsculas. Asimismo, se han empleado las siguientes abreviaturas:

AD: Aurícula derecha	NKX2.5: Gen NK2 homeobox 5
AG: Ácidos grasos	O₂: Oxígeno molecular
AI: Aurícula izquierda	ODD: Dominio de degradación por oxígeno
BNIP3: Proteína 3 de interacción con BCL2	PA: Potencial de acción
BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina	PDK1: Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
CAT: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	PFA: Paraformaldehído
ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina	PGC1α: Coactivador del receptor peroxisomal gamma 1 alfa
CoA: Coenzima A	PHD: Prolil-hidroxilasa
COX4: Subunidad 4 de la Citocromo c Oxidasa	PO₂: Presión arterial de oxígeno
CX40: Conexina 40	qPCR: PCR cuantitativa
DAB: 3,3'-diaminobencidina	RMN-¹H: Resonancia magnética nuclear de protón
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol	ROS: Especies reactivas de oxígeno
DHR: Dihidrorodamina	SC: Sistema de Conducción
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético	SCVP: Sistema de Conducción ventricular periférico
EPDCs: Células derivadas del epicardio	SHF: Campo cardiaco secundario
FHF: Campo cardiaco primario	SIV: Septo interventricular
GLUT: Transportador de glucosa	SP1: Factor de transcripción SP1
HIF: Factor inducible por hipoxia	TAG: Triacilglicéridos
HRE: Elemento de respuesta a hipoxia	TBX5: Gen caja T 5
LDHA: Lactato deshidrogenasa	TEM: Transición epitelio-mesénquima
MC: Miocardio compacto	TnTc: Troponina T cardiaca
MET: Microscopía electrónica de transmisión	TSP: Ácido trimetilsililpropanoico
aMHC: Cadena pesada de la miosina alfa	VD: Ventrículo derecho
Mlc2v: Cadena ligera de la miosina 2v	VHL: Proteína von Hippel-Lindau
mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial	VI: Ventrículo izquierdo
mTOR: Diana de la rapamicina de mamíferos	WGA: Aglutinina de germen de trigo
MXI1: Proteína de interacción con Max 1	
NIX: Proteína tipo 3 de interacción con BCL2	

INTRODUCCIÓN

1 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CORAZÓN EN RATÓN

El corazón es el primer órgano en formarse durante el desarrollo embrionario, debido al papel vital que juega en la distribución de oxígeno y nutrientes por todo el embrión. Está formado por diferentes tipos celulares, incluyendo cardiomiocitos, células del endocardio, tejido conectivo, fibroblastos, células del Sistema de Conducción, fibras y ganglios nerviosos, células musculares lisas y células endoteliales, mayoritariamente (Brade y cols., 2013). La formación del corazón comprende múltiples etapas, descritas en la Figura 1. Estas etapas involucran diversos procesos de diferenciación, migración, proliferación y maduración.

Existen diferentes tipos de progenitores cardíacos que, atendiendo a su origen y contribución a diferentes estructuras, pueden clasificarse como:

- ✦ Progenitores mesodérmicos: Originados del mesodermo lateral. Contribuyen a la mayoría de células del corazón. Principalmente originan el miocardio auricular, ventricular y del tracto de salida, así como el endocardio, el Sistema de Conducción y los cojines aórticos y pulmonares (Cai y cols., 2003; Buckingham y cols., 2005; Moretti y cols., 2006; Laugwitz y cols., 2008;).
- ✦ Progenitores epicárdicos: Originados a partir del órgano proepicárdico. Forman la capa más externa del corazón, o epicardio. Aunque forman una población heterogénea, contribuyen a fibroblastos intersticiales, así como a varias capas de los vasos coronarios, principalmente células de músculo liso vascular y fibroblastos de la adventicia, y en menor medida a células endoteliales. Su posible contribución a cardiomiocitos, si bien reducida, es aún controvertida y no ha sido completamente aceptada (Cai y cols., 2008; Perez-Pomares y de la Pompa, 2011; Zhou y cols., 2008)
- ✦ Progenitores cardíacos de la cresta neural: Originados en el tubo neural dorsal y que, por migración a través de los arcos branquiales, contribuyen a células de músculo liso vascular de la parte distal del tracto de salida, separando la aorta y el tronco pulmonar, al sistema nervioso autónomo del corazón e influyen indirectamente en el correcto desarrollo de las válvulas y los diferentes septos intercamerales (Brown y Baldwin, 2006; Nakamura y cols., 2006; Porras y Brown, 2008; Waldo y cols., 1998).

1.1 Etapas del desarrollo de corazón en ratón

1.1.1 Progenitores mesodérmicos y formación del tubo cardíaco

1.1.1.A Formación del tubo cardíaco lineal

Inicialmente, a día embrionario 7.0 (E7.0), tiene lugar la especificación del mesodermo cardíaco, marcado por la expresión del factor de transcripción del Mesodermo Posterior 1 (*Mesp1*, del inglés

Mesoderm Posterior 1), el primer marcador cardíaco detectable. Los progenitores cardíacos *Mesp1*⁺ se localizan en la región anterior de la línea media primitiva (Kitajima y cols., 2000)

Medio día después, a E7.5, parte de los progenitores mesodérmicos *MESP1*⁺ migran hacia el mesodermo lateral anterior y forman la cresta cardíaca, con forma de media luna. Antes de la formación del tubo cardíaco a día E8.0, esta zona del mesodermo cardiogénico, donde residen los progenitores cardíacos, prolifera muy activamente (de Boer y cols., 2012). En este punto, la activación de *Mesp1* permite el establecimiento de una red de factores de transcripción esenciales para la cardiogénesis: *Gata4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Hand1/2* y *Tbx5* (Bondue y cols., 2008; Martin-Puig y cols., 2008).

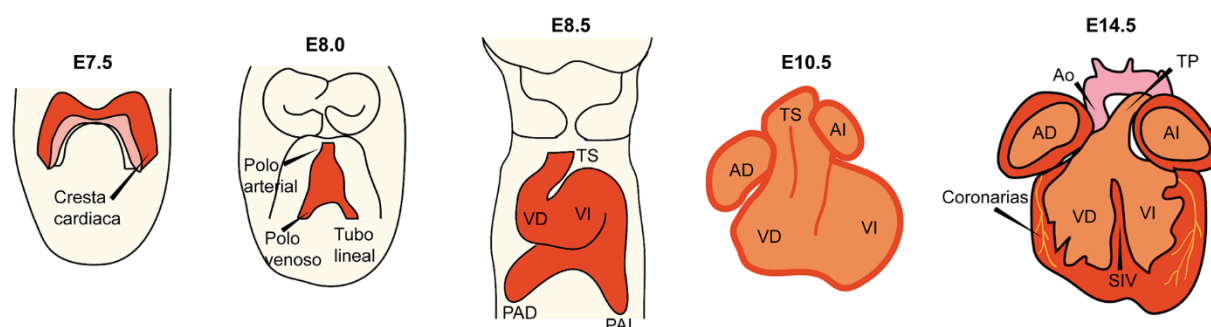


Figura 1 - Representación esquemática del desarrollo embrionario del corazón

Los progenitores localizados en la cresta cardíaca a E7.5 migran para formar el tubo cardíaco lineal a E8.0. A E8.5 el tubo sufre un giro. A E10.5, las aurículas, que forman el polo venoso, sufren una inversión y se colocan en posición craneal, quedando las cámaras alineadas en su disposición final. Estas cámaras interconectadas se separan por septación a E14.5, estadio a partir del cual el corazón sufre distintos procesos de maduración. TS: tracto de salida, VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, PAD: pro-aurícula derecha, PAI: pro-aurícula izquierda, AD: aurícula derecha, AI: aurícula izquierda, SIV: septo interventricular, Ao: aorta, TP: tronco pulmonar. Adaptado de Buckingham y cols., 2005.

Parte de los progenitores residentes en estas estructuras cardíacas iniciales forman el campo cardíaco primario, o FHF (del inglés, *First Heart Field*). El FHF comienza a migrar hacia una posición medial y ventral hasta fundirse en la línea media del embrión, dando lugar al tubo lineal cardíaco a E8.0, donde comienza a detectarse un movimiento peristáltico del miocardio y la sangre empieza a circular. A medida que estos progenitores del FHF se añaden al tubo se reduce drásticamente su capacidad proliferativa, al mismo tiempo que comienzan a diferenciarse al linaje miocárdico para dar lugar a cardiomiocitos (Martin-Puig y cols., 2012). Esta primera oleada de progenitores del FHF contribuirá al ventrículo izquierdo (VI) y a parte de las aurículas en el corazón maduro (Meilhac y cols., 2004) (Fig. 2A). Este tubo cardíaco primitivo está formado por una capa externa de miocardio y un revestimiento interno de células endocárdicas, un tipo endotelial específico del corazón. Ambas capas están separadas por una capa de tejido conectivo rica en proteoglicanos conocida como “gelatina” cardíaca (Risebro y Riley, 2006). El extremo más craneal del tubo, denominado polo arterial, dará lugar al futuro tracto de salida, mientras que el extremo más caudal, denominado polo venoso, se corresponde con las futuras aurículas y el tracto de entrada.

1.1.1.B Adición de progenitores del campo cardiaco secundario

Dentro de los progenitores del mesodermo cardiaco se ha descrito otro subtipo, además de los del FHF, que adopta una posición posterior y medial, dando lugar al denominado campo cardiaco secundario, o SHF (del inglés, *Second Heart Field*), que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción *Islet1* (*Isl1*). Estos progenitores permanecen en la zona del mesodermo faríngeo en un estado indiferenciado y proliferativo en las etapas iniciales de formación del tubo lineal primitivo, hasta su incorporación al mismo en torno a E8.0 (Cai y cols., 2003; Waldo y cols., 2005). La incorporación tiene lugar por ambos polos del tubo, contribuyendo a la elongación del mismo. A medida que los progenitores del SHF entran en el tubo, se suprime la expresión de *Isl1*, hay una parada proliferativa y comienza el proceso de diferenciación (Buckingham y cols., 2005). Los progenitores del SHF contribuyen al tracto de salida, a gran parte del ventrículo derecho (VD), en pequeña medida al VI y a parte de las aurículas, además de al linaje muscular liso y al endotelial en la base de los grandes vasos, parte del Sistema de Conducción y de la válvula aórtica (Moretti y cols., 2006; Sun y cols., 2007) en el corazón maduro (Fig. 2A).

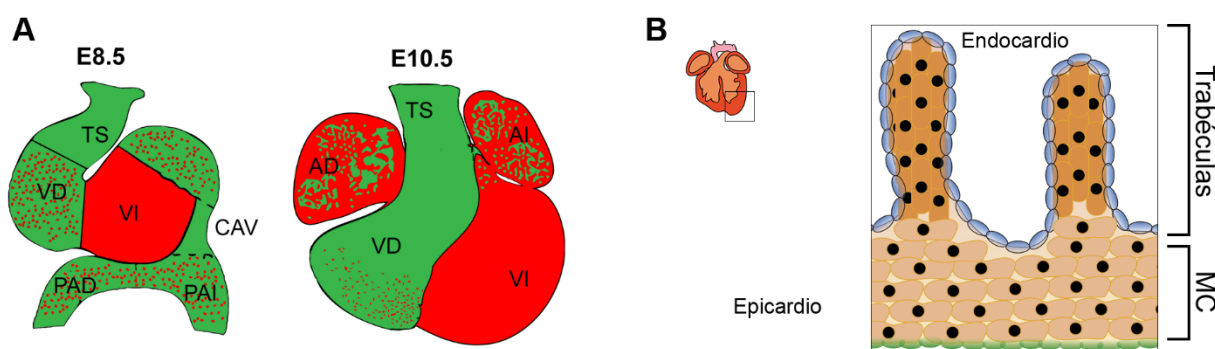


Figura 2 - Campos cardiacos y compartimentos anatómicos del corazón en desarrollo

A) El campo cardiaco primario, en rojo, contribuye a cardiomiocitos del ventrículo izquierdo y gran parte de las aurículas. El campo cardiaco secundario, en verde, contribuye a cardiomiocitos del ventrículo derecho, del tracto de salida y parcialmente a las aurículas. Adaptado de Buckingham y cols., 2005. **B)** Esquema representando la pared del miocardio embrionario. Se muestra el epicardio (verde), el miocardio compacto (MC, naranja claro), las trabéculas (naranja oscuro) y el endocardio (azul). TS: tracto de salida, VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, CAV: canal atrioventricular, PAD: pro-aurícula derecha, PAI: pro-aurícula izquierda, AD: aurícula derecha, AI: aurícula izquierda.

1.1.1.C Giro del tubo cardiaco, alineamiento de las cámaras y reactivación de la proliferación

Durante la incorporación de los progenitores del SHF, a E8.5 el tubo cardiaco primitivo sufre un movimiento de torsión hacia el lado derecho, conocido como *cardiac looping* (Watanabe y Buckingham, 2010). Este giro asegura que las futuras cámaras se posicionen en el orden y orientación adecuados con respecto a las regiones de entrada y salida de la sangre.

Además, al mismo tiempo que sucede el giro, tiene lugar la reactivación de la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos en las zonas de curvatura externa. Este modelo, conocido como el “modelo en globo” (*ballooning model*) (Christoffels y cols., 2000), establece que las cámaras primordiales se alinean siguiendo la curvatura externa del tubo. Así, la proliferación en zonas específicas de la curvatura externa

garantiza la expansión y crecimiento de las cámaras ventriculares, que protruyen hacia el exterior del tubo. Por otro lado, el giro, junto con la inversión del polo venoso hacia una posición craneal, permite que las cámaras queden alineadas en su disposición final. Además, dos días más tarde, a E10.5, los tractos de salida y de entrada se alinean entre ambos ventrículos, quedando así la región vascular orientada en posición definitiva con las diferentes cámaras del corazón.

1.1.2 Expansión y especificación de las cámaras ventriculares

Una vez que la identidad de las cámaras está fijada y éstas han adoptado su disposición final, el miocardio inicia un proceso de expansión que asegure el correcto bombeo de la sangre a medida que el embrión crece. Este crecimiento, que tiene lugar mediante un incremento en el número de células por proliferación de cardiomiocitos preexistentes (hiperplasia), ocurre de forma discontinua entre E10.5 y E14.5, en las regiones de curvatura externa siguiendo el modelo de *ballooning* mencionado previamente (Christoffels y cols., 2000). Al mismo tiempo, el corazón en desarrollo tiene que responder a señales destinadas a la correcta septación de las cámaras. Todos estos procesos están regulados por un conjunto de factores de transcripción, como *Nkx2.5*, *Isl1*, *Foxh1*, *Mef2c*, *Hand* y varios factores *Tbx*, algunos de los cuales presentan patrones de expresión específicos de cada cámara. Por ejemplo, los factores bHLH, *Hand1* y *Hand2*, se expresan de forma predominante en el VI y VD, respectivamente (Srivastava y cols., 1997) o *Tbx5*, que se expresa en forma de gradiente en las aurículas, tracto de entrada y VI (Bruneau y cols., 1999).

1.1.3 Maduración de las cámaras ventriculares

Una vez alineadas las cámaras y establecida su identidad tienen lugar diversos procesos de maduración de las mismas. En el caso de los ventrículos, pueden distinguirse 3 etapas distintas dentro del proceso de maduración: (1) formación de las trabéculas, (2) establecimiento del Sistema de Conducción (SC) ventricular y (3) engrosamiento del miocardio compacto.

1.1.3.A Formación de las trabéculas

Tras el proceso de giro, a E9.5, el corazón está formado por una capa de 1-2 cardiomiocitos denominada miocardio compacto (MC). A partir del MC se desarrollan unas prolongaciones similares a dedos hacia la luz (interior) de las cámaras (Staudt y cols., 2014). Estas prolongaciones, conocidas como trabéculas, están recubiertas de endocardio y suponen el 80% de la masa del corazón entre E9.5 y E14.5 (Blausen y cols., 1990). Los cardiomiocitos trabeculares se caracterizan por su menor tasa proliferativa y una mayor maduración de las estructuras sarcoméricas (Martin-Puig y cols., 2008a; Sedmera y cols., 2000; Sedmera y cols., 2003). De este modo, los ventrículos embrionarios, en este punto, pueden dividirse en dos estructuras anatómicas diferentes: una capa más externa de cardiomiocitos estrechamente unidos (MC)

y el miocardio trabeculado o trabéculas (Fig. 2B). Éstas últimas cumplen varias funciones, entre las que destacan las siguientes:

- ✦ Aumentar la superficie de intercambio de oxígeno del miocardio antes de la aparición de la vasculatura coronaria.
- ✦ Colaborar en la separación del flujo de sangre entre las distintas cámaras antes de que se complete el proceso de tabicación.
- ✦ Contribuir al desarrollo del Sistema de Conducción.

La trabeculación consta de 3 etapas principales (Samsa y cols., 2013), cada una de ellas distinguible en base a los cambios anatómicos que se producen:

1. Aparición: Comienza a E9.5. A partir de la pared del ventrículo se desarrollan unas protrusiones hacia el lado luminal del mismo, en la parte correspondiente a la curvatura externa (Moorman y Christoffels, 2003). Varios estudios apoyan la idea de que las trabéculas aparecen por invaginación, mediante delaminación de cardiomiocitos del MC (Liu y cols., 2010; Peshkovsky y cols., 2011).
2. Trabeculación: A continuación, las trabéculas se propagan radialmente, formando una red en la que las células localizadas en posición más apical están más diferenciadas que las de la base (Sedmera y Thompson, 2011).
3. Remodelado: También conocido como compactación, es un proceso diferente al engrosamiento del MC durante la trabeculación. Durante el remodelado, las trabéculas cesan su crecimiento hacia el lumen ventricular y comienzan a engrosarse, a medida que sus respectivas bases colapsan. Los espacios entre las trabéculas se transforman en capilares (Sedmera y cols., 2000).

El proceso de trabeculación requiere una compleja señalización, parte de la cual no se conoce por completo, si bien está claro que debe establecerse una estrecha comunicación entre el miocardio y el endocardio para que las trabéculas se desarrollen adecuadamente. Existen varios genes implicados en este proceso, como la Neuregulina 1 (*Nrg1*) (ligando expresado en el endocardio) y sus receptores miocárdicos *ErbB2* y *ErbB4* (Gassmann y cols., 1995; Lee y cols., 1995; Meyer y Birchmeier, 1995), el ligando miocárdico Angiopoyetina y sus receptor endocárdico *Tie2* (Suri y cols., 1996) o la señalización de la ruta de Notch en el endocardio, que modula la proliferación de los cardiomiocitos al promover la expresión de *Bmp10* en el miocardio (Chen y cols., 2004; Grego-Bessa y cols., 2007).

1.1.3.B Engrosamiento del miocardio compacto

Al mismo tiempo que se desarrollan las trabéculas, el MC sufre un proceso inicial de engrosamiento desde E11.5 hasta E14.5. A partir de este punto, a medida que el proceso de remodelado de las trabéculas avanza, el MC pasa a ser la estructura que proporciona la mayor masa del corazón, así como

la principal fuerza contráctil a partir de E16.5, aunque continúa aumentando en complejidad estructural (Wessels y Sedmera, 2003). Los cardiomiocitos del MC están menos diferenciados que los trabeculares en cuanto a estructura sarcomérica y complejidad celular. Sin embargo, debido a la expresión activa de *Mycn* (Oncogén MYC Neuroblastoma, del inglés *Neuroblastoma MYC Oncogene*), su capacidad proliferativa es mayor (Sedmera y Thompson, 2011; Chen y cols., 2004).

Una de las principales rutas implicadas en la regulación de la proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo es la ruta del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*). En concreto, la principal isoforma implicada en el proceso es FGF2, producida tanto a nivel del epicardio como de los propios cardiomiocitos de manera autocrina. Además de estas señales, factores de origen endocárdico juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación del MC, como *Nrg1* (Meyer y Birchmeier, 1995) o Endotelina 1 (*Edn1*), a través de la activación de la ruta de la Tirosina Quinasa relacionada con ELR, (ERK, del inglés ELR-Related Tyrosine Kinase) (Sugden, 2003) Por otro lado, para que el MC prolifere también son necesarios mitógenos epicárdicos, como la Eritropoyetina (EPO), el Factor de Crecimiento Insulínico 2 (IGF2, del inglés *Insulin-like Growth Factor 2*) en etapas anteriores a E12.5 (Shen y cols., 2015) o el ácido retinoico, implicado en la estimulación de la secreción de factores tróficos epicárdicos que median la proliferación del MC y cuya deficiencia provoca fallos en la misma (Martin-Puig y cols., 2008; Wessels y Perez-Pomares, 2004)

1.1.3.C Formación del Sistema de Conducción ventricular

En el corazón maduro, el impulso eléctrico que inicia la contracción de los cardiomiocitos se genera mediante la aparición de un potencial de acción (PA) en el nodo sinoauricular, lo que permite la contracción de las aurículas. A continuación, el PA sufre un retraso en el nodo atrioventricular y atraviesa el haz atrioventricular y sus ramas para iniciar la contracción ventricular: a medida que el PA recorre las fibras de Purkinje del Sistema de Conducción ventricular periférico (SCVP). El SCVP es el responsable de la despolarización de los ventrículos, de forma rápida y coordinadamente entre todos los cardiomiocitos. Cada componente del SC presenta diferentes características en términos de morfología y expresión génica, pero como característica común, todos ellos poseen un retículo sarcoplásmico y un sistema de sarcómeras poco desarrollados, así como un bajo número de mitocondrias (Munshi, 2012).

La formación del SC requiere diversos procesos de crecimiento y diferenciación que tienen que tener lugar de forma coordinada para el correcto desarrollo del corazón. Si bien es sabido que las trabéculas juegan un papel importante en el establecimiento del SC su origen no está del todo claro y se ha propuesto que progenitores del SHF del mesodermo cardiaco pueden contribuir a diversas estructuras del SC, incluyendo los nodos (Moretti y cols., 2006; Sun y cols., 2007). Por un lado, existe consenso en

que la inducción de la diferenciación a un fenotipo de SC estaría determinada por señales provenientes de células endoteliales, existen dos modelos propuestos:

- ✦ Modelo *out-growth*: Según este modelo, el patrón de expresión de distintos marcadores definiría poblaciones de progenitores del SC, organizados en anillos a lo largo del tubo cardiaco (Christoffels y Moorman, 2009; Gourdie y cols., 2003).
- ✦ Modelo de reclutamiento: Este modelo, propuesto inicialmente en base a estudios de trazado de linaje en modelos aviares (Mikawa y Hurtado, 2007), propone la existencia de progenitores comunes a los cardiomiocitos del SC y a los cardiomiocitos contráctiles.

Estudios genéticos posteriores de mapeo de destino celular (*genetic fate mapping*) (Miquerol y cols., 2010), junto con el hallazgo de clones mixtos de células del SC y de cardiomiocitos contráctiles mediante trazado de linaje (Cheng y cols., 1999; Gourdie y cols., 1995) han permitido conciliar ambos modelos en un modelo bifásico de desarrollo del SC. Así, los cardiomiocitos del SC se desarrollarían a partir de un progenitor común a los cardiomiocitos contráctiles, seguido de procesos limitados de proliferación.

Independientemente del modelo propuesto, existen diversos genes clave para el establecimiento del SC. El gen caja T 3 (*Tbx3*, del inglés *T-box 3*) permite la especificación del SC atrioventricular al reprimir la expresión de genes contráctiles (Hoogaars y cols., 2004; Miquerol y cols., 2011). Por otro lado, el gen caja T5 (*Tbx5*, del inglés *T-box 5*) está implicado en la maduración morfológica de los cardiomiocitos del SC, además de ser el principal activador transcripcional del gen de la Conexina 40 (*Cx40*) (Miquerol y cols., 2011). El empleo de una Cre inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor del gen *Cx40*, en combinación con un gen chivato, ha permitido determinar que, si bien en etapas anteriores a E16.5 *Cx40* se expresa en ambos tipos de cardiomiocitos, a partir de ese punto su expresión se restringe a las células del SC ventricular (Beyer y cols., 2011).

Por otro lado, la acción de *Tbx5* no sólo es necesaria, sino que existe una estrecha cooperación entre *Tbx5* y *Nkx2.5* (Moskowitz y cols., 2007). Este efecto se lleva a cabo mediante la expresión del Inhibidor de Diferenciación 2 (*Id2*, del inglés *Inhibitor of Differentiation 2*), el cual reprime la expresión de genes relacionados con un fenotipo contráctil (Christoffels y Moorman, 2009). Además, tanto *Edn1* como *Nrg1* juegan un papel fundamental en el desarrollo del SC. Por un lado, la *Edn1* es requerida para la inducción y mantenimiento del fenotipo SCVP en cardiomiocitos subendocárdicos (Pennisi y cols., 2002), mientras que *Nrg1* regula la proporción relativa de cardiomiocitos que se diferencian hacia uno u otro fenotipo y mantiene el fenotipo trabecular (Hertig y cols., 1999),

1.1.4 Procesos postnatales de maduración

Si bien la tasa proliferativa del corazón embrionario es elevada, tras el nacimiento la capacidad de generación de nuevos cardiomiocitos cae rápidamente (Foglia y Poss, 2016; Martin-Puig y cols., 2012).

Durante las dos primeras semanas de vida, el corazón continúa creciendo, si bien a expensas de procesos de hipertrofia (aumento de tamaño celular sin aumento neto en el número de células) de los cardiomiocitos, en vez de a través de la proliferación por hiperplasia (generación de nuevas células por división) de los mismos (Li y cols., 1996). Además, tiene lugar un proceso progresivo de binucleación de los cardiomiocitos, ya que en torno a día postnatal 5 la mayoría de los cardiomiocitos llevan a cabo una última replicación de ADN no seguida de citocinesis (separación del citoplasma) efectiva (Walsh y cols., 2010), de forma que a día postnatal 21 el 85%-90% de los cardiomiocitos son binucleados (Soonpaa y cols., 1996). Esta parada de ciclo celular es debida tanto a la disminución de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) de G1/S y G2/M, como al aumento de sus inhibidores, como Ciclina D2, Ciclina D3, CDK2 y 3 (del inglés *Cyclin Dependent Kinase*), P21 (*Ckd1a*, del inglés *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) o P27 (*Cdkn1b*, del inglés *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*) (Engel y cols., 2005; Flink y cols., 1998). Además, recientemente se ha propuesto que el factor de transcripción Meis1 juega un papel importante en el descenso de la proliferación en etapas postnatales debido a que mantiene elevados niveles de los inhibidores de ciclinas P21, P15 (*Cdkn2a*) y P16 (*Cdkn2b*) (Mahmoud y cols., 2013).

1.2 Progenitores epicárdicos

El epicardio es una monocapa epitelial que recubre el corazón por su parte externa. Es una estructura dinámica fundamental para la correcta cardiogénesis y cumple diversas funciones:

- ✦ Proporciona progenitores que darán lugar a diversos linajes, principalmente células de músculo liso vascular (Olivey y Svensson, 2010), fibroblastos intersticiales (Acharya y cols., 2012) y, en un pequeño porcentaje, cardiomiocitos (Cai y cols., 2008; Zhou y cols., 2008). Diversos estudios de trazado de linaje apuntan a que la contribución del epicardio al endotelio vascular coronario es muy baja o nula (Grieskamp y cols., 2011; Perez-Pomares y De La Pompa, 2011). Sin embargo, el potencial endotelial del epicardio todavía es controvertido en el campo y se piensa que existe algún subtipo de progenitores del epicardio que sí presentan ese potencial endotelial (Katz y cols., 2012).
- ✦ Es una fuente de señales paracrinas que participan en el correcto desarrollo del miocardio subyacente, principalmente a nivel de proliferación y supervivencia (Martin-Puig y cols., 2008; Perez-Pomares y de la Pompa, 2011).

El epicardio se origina a partir del órgano proepicárdico, una masa de células localizada fuera del corazón primitivo, en la parte ventral del seno venoso, que alcanza su tamaño máximo a E9.5 (Clowes y cols., 2014) (Fig. 3, izquierda). Esta estructura transitoria está formada por distintas subpoblaciones de progenitores epicárdicos, cada una con distinto potencial de diferenciación (Krainock y cols., 2016). En torno a E9.5, grupos de células del proepicardio comienzan a liberarse a la cavidad pericárdica (Viragh

y Challice, 1981) y se adhieren a la superficie del corazón a nivel del canal atrioventricular (Wengerhoff y cols., 2010). A partir de este momento, el epicardio se forma por migración de las células que han migrado desde el proepicardio, pero también por proliferación de las mismas (Peralta y cols., 2013; Wu y cols., 2010), hasta recubrir por completo la superficie del corazón en desarrollo.

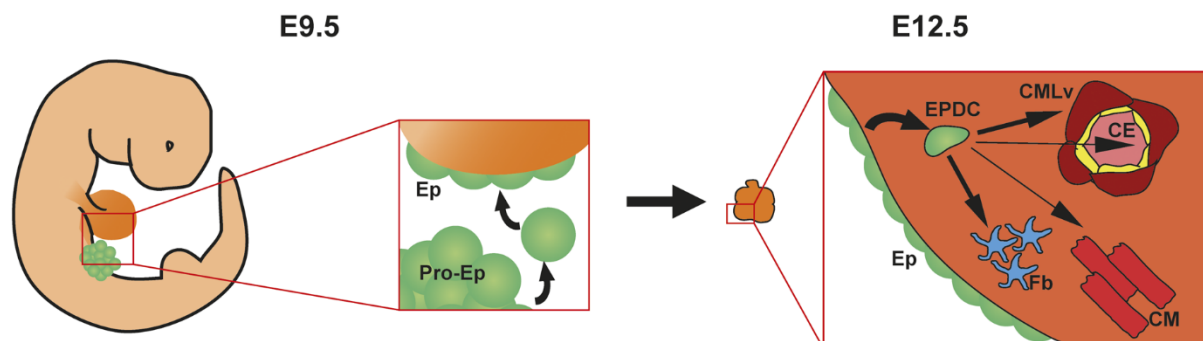


Figura 3 - Desarrollo del epicardio

A partir de E9.5, los progenitores que componen el órgano proepicardio (Pro-Ep) comienzan a delaminarse hacia la cavidad pericárdica y adherirse a la superficie del miocardio. Una vez recubierto todo el miocardio, a partir de E12.5, algunos progenitores epicárdicos sufren un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), originándose así las células derivadas del epicardio (EPDCs), que migran hacia el interior del miocardio en respuesta a señales tróficas del mismo, para dar lugar a distintos tipos celulares: células de músculo liso vascular (CMLv), fibroblastos intersticiales (Fb) y en muy baja frecuencia a cardiomiocitos (CM). Además, una fracción de estos progenitores (Sema3d⁺/Scx⁺) podría contribuir a endotelio coronario (CE).

Una vez que el epicardio está completamente formado, en torno a E12.5, las células epicárdicas inician un proceso de transformación epitelio-mesénquima (TEM). Las células resultantes, denominadas Células Derivadas del Epicardio (EPDC, del inglés *Epicardial Derived Cells*), con gran capacidad migratoria en respuesta a distintas señales secretadas por los cardiomiocitos subyacentes, invaden el miocardio, donde posteriormente tienen lugar los procesos de diferenciación (Krainock y cols., 2016; Martin-Puig y cols., 2008; Perez-Pomares y de la Pompa, 2011) (Fig. 3, derecha).

1.2.1 Formación de la vasculatura coronaria

Los primeros vasos sanguíneos del corazón son estructuras formadas por vasculogénesis, o fusión de progenitores vasculares, formándose una estructura vascular *de novo* (Pérez-Pomares y cols., 1998; Ratajska y cols., 2008) en el espacio subepicárdico (Olivey y Svensson, 2010). Una vez formado el plexo primario en torno a E11.5 (Olivey y cols., 2004), se inicia la formación de una red de capilares que recorren el miocardio por angiogénesis. En este proceso intervienen varias señalizaciones, principalmente Angiopoyetina 2 y su receptor TIE2 (von Kodolitsch y cols., 2004) y además VEGFA, cuya expresión está dirigida a su vez por un gradiente de hipoxia del epicardio al endocardio (Ferrara y cols., 2003; Pugh y Ratcliffe, 2003).

Si bien la formación del epicardio promueve activamente el establecimiento del plexo primario, al dar origen al mencionado espacio subepicárdico (Pires-Gomes y Pérez-Pomares, 2013), el origen del endotelio coronario todavía es controvertido. Por un lado, los estudios originales de trazado de linaje

en ratón para *Wt1* y *Tbx18* no identificaron una contribución significativa del epicardio al endotelio coronario (Cai y cols., 2008; Zhou y cols., 2008). Estudios más recientes demuestran la heterogeneidad de los progenitores epicárdicos y demuestran la contribución relativa de un subgrupo de progenitores del epicardio positivos para Semaforina 3D (*Sema3D*) y Escleraxis (*Scx*) al endotelio coronario (Katz y cols. 2012). Otros autores han propuesto el endocardio (Wu y cols., 2012) o el endotelio del seno venoso (Red-Horse y cols., 2010) como origen del endotelio coronario. Sin embargo, el trabajo de Katz y colaboradores (Katz y cols., 2012) demuestra la contribución, al menos parcial, de progenitores epicárdicos *Sema3D* y *Scx* al seno venoso y al endocardio, respectivamente. De este modo, podrían conciliarse los diferentes orígenes del endotelio coronario durante la formación de la vasculatura coronaria.

Además de células endoteliales, también es necesario el reclutamiento de células de músculo liso vascular y de fibroblastos. La aparición de las EPDCs a través de procesos de TEM supone la aparición de un conjunto de progenitores con diversos potenciales de diferenciación que contribuirán al desarrollo coronario una vez establecidas las estructuras endoteliales. Tanto los progenitores epicárdicos *Tbx18* como *Wt1* contribuyen a la formación de la capa de músculo liso vascular de las arterias coronarias (Cai y cols., 2008; Zhou y cols., 2008b). Los Receptores del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas α y β (PDGFR α y β , del inglés *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) favorecen la diferenciación de las EPDCs a células de músculo liso vascular en un proceso dependiente del ácido retinoico epicárdico (Guadix y cols., 2011). Por otra parte, está ampliamente aceptado que los fibroblastos de la adventicia tienen un origen epicárdico (Perez-Pomares y de la Pompa, 2011), identificados mediante la expresión del Factor de Transcripción 21 (*Tcf21*) (Acharya y cols., 2012).

La vasculatura coronaria madura tiene dos componentes diferentes, tanto a nivel estructural como funcional: las arterias y las venas. Sin embargo, la diferenciación entre arteria coronaria y vena no ha sido muy estudiada. Los trabajos existentes sugieren un origen diverso: bien por reprogramación de las células endoteliales originadas en el seno venoso antes de E9.5 hacia un fenotipo arterial (Red-Horse y cols., 2010) o bien un origen diferente del endotelio arterial a partir del endocardio a E11.5 (Wu y cols., 2012). La ruta de señalización de Notch es un importante mediador de este proceso, favoreciendo un fenotipo arterial (Pires-Gomes y Pérez-Pomares, 2013). Además, existen marcadores específicos para cada tipo de endotelio: el ligando transmembrana Efrina B2, así como la Neurofilina 1, entre otros, se expresan en arterias, mientras que tanto el receptor tirosina quinasa Efrina B4 como el factor de determinación derecha-izquierda *Lefty1* se expresan en el endotelio venoso (Niessen y Karsan, 2007; Wang y cols., 1998).

2 LA RUTA DE RESPUESTA CELULAR A HIPOXIA

El oxígeno se ha convertido en un requerimiento celular crítico. Por una parte, es esencial para una producción efectiva de ATP a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y por otra, su privación induce señales celulares de estrés, mientras que fluctuaciones en los niveles de oxígeno están asociadas a la acumulación de radicales libres, con el consiguiente riesgo de daño en proteínas y ADN (Majmundar y cols., 2010). Además, la hipoxia es un factor ambiental asociado a la aparición de diversas enfermedades como alteraciones de la hemoglobina, anemia y progresión tumoral, así como hipertensión pulmonar, enfermedades pulmonares crónicas o insuficiencia cardíaca (Allemann y cols., 2004) o alteraciones del miocardio en condiciones de preeclampsia durante el desarrollo embrionario (Melchiorre y cols., 2012).

El cuerpo carotídeo es el principal sensor de la presión arterial de oxígeno (PO_2) y, ante una bajada en la PO_2 , desencadena respuestas de aclimatación a hipoxia, como el aumento de la frecuencia cardíaca, presión arterial y tensión pulmonar, vasoconstricción, aumento de la perfusión tisular y del hematocrito y hemoglobina (Lopez-Barneo y cols., 2016; Prabhakar, 2013). Parte de estas respuestas de adaptación a hipoxia se inician a nivel celular mediante la activación de un programa génico orientado a ajustar los requerimientos de oxígeno celulares a la situación de hipoxia, e incluyen fenómenos como la parada del ciclo celular, la disminución del metabolismo mitocondrial y la secreción de diversos factores de supervivencia entre otros (Majmundar y cols., 2010).

La principal ruta de respuesta celular a los bajos niveles de oxígeno es la mediada por los Factores Inducibles por Hipoxia (HIFs, del inglés *Hypoxia Inducible Factors*). Los HIFs son heterodímeros, formados por dos subunidades, α y β . La subunidad β , también denominada Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (ARNT, del inglés *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), se expresa de forma constitutiva y no se regula por oxígeno. Existen tres subunidades α en mamíferos (Wang y cols., 1995): 1α , 2α o EPAS1 (del inglés *Endothelial PAS domain-containing protein 1*) y 3α , con distintas variantes de splicing, algunas de ellas con actividad inhibidora por competición en la unión a la subunidad β (Kaelin y Ratcliffe, 2008). De las tres, HIF1 α tiene expresión ubicua mientras que HIF2 α y HIF3 α se expresan sólo en determinados tejidos, como células endoteliales, neumocitos de tipo II, células renales intersticiales, células del parénquima hepático y en el linaje mieloide (Bertout y cols., 2008). Las subunidades α dimerizan con la subunidad β a través de los dominios bHLH (del inglés, *basic-helix-loop-helix*) y PAS (*Per, Arnt, Sim*) (Fig. 4A) y el heterodímero resultante se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de los genes de adaptación a hipoxia por unión a los Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE, del inglés *Hypoxia Responsive Element*, con la secuencia consenso G/ACGTG) (Majmundar y cols., 2010).

2.1 Regulación de los factores HIF

La regulación de las subunidades α por oxígeno se lleva a cabo mediante las enzimas HIF proлил-хидрохилазас (PHDs, del inglés *Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein*). Las PHDs pertenecen a la superfamilia de las proлил-4-хидрохилазас, o dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que participan en multitud de procesos celulares, entre los que se incluyen la хидрохилаción del colágeno, el metabolismo de ácidos grasos y la reparación del ADN (Myllyharju, 2013). Todas ellas requieren Fe^{2+} , 2-oxoglutarato, oxígeno y ascorbato para llevar a cabo la reacción de хидрохилаción. Existen 3 genes que codifican para tres isoenzimas diferentes en mamíferos, *Phd1*, *Pdh2* y *Pdh3* (también nombrados como *Egln2*, *Egln1* y *Egln3*, respectivamente) (Bruick y McKnight, 2001). En condiciones de normoxia, las PHDs хидрохилан la subunidad HIF α en residuos de prolina conservados (Pro-402 y Pro-577 en HIF1 α y Pro-405 y Pro-530 en HIF2 α de ratón) localizados en el dominio de Degradación dependiente de Oxígeno (ODD, del inglés *Oxygen-Dependent Degradation*) (Jiang y cols., 1997; O'Rourke y cols., 1999). Esta modificación post-traducciona l de хидрохилаción en prolina es reconocida por la proteína von Hippel-Lindau (VHL), que actúa como subunidad de reconocimiento y unión de sustrato de un complejo E3 ubiquitin-ligasa (Hsu, 2012). De este modo, HIF α es ubiquitilado, lo que sirve como marca para su degradación proteasomal (Kaelin y Ratcliffe, 2008). En hipoxia, la bajada en los niveles de oxígeno disponible impide que las PHDs lleven a cabo la reacción de хидрохилаción. Esta inhibición de las PHDs permite que la subunidad HIF α escape a la degradación por el proteasoma, heterodimerice con la subunidad β y medie la transcripción de los genes diana de respuesta a hipoxia (Ivan y cols., 2001; Jaakkola y cols., 2001) (Fig. 4B).

Existe una regulación adicional de las subunidades HIF α consistente en la хидрохилаción en un residuo específico de asparagina (Asn-813 en HIF1 y Asn-851 en HIF2 α en ratón). Esta modificación, llevada a cabo en normoxia por la asparagil-хидрохилаза denominada Factor Inhibidor de HIF (FIH, del inglés *Factor Inhibiting HIF*), impide la unión de HIF α a los coactivadores transcripcionales p300/CBP, reprimiendo la capacidad transcripcional del heterodímero α/β , como un mecanismo de seguridad adicional, en caso de que alguna subunidad α escape a la degradación proteasomal (Mahon y cols., 2001) (Fig. 4B).

2.2 Prolil-хидрохилазас

Las PHDs constituyen la principal vía de regulación de los factores HIF. Por este motivo, se han propuesto como sensores celulares de oxígeno, modulando la respuesta a hipoxia en función de la concentración celular de oxígeno.

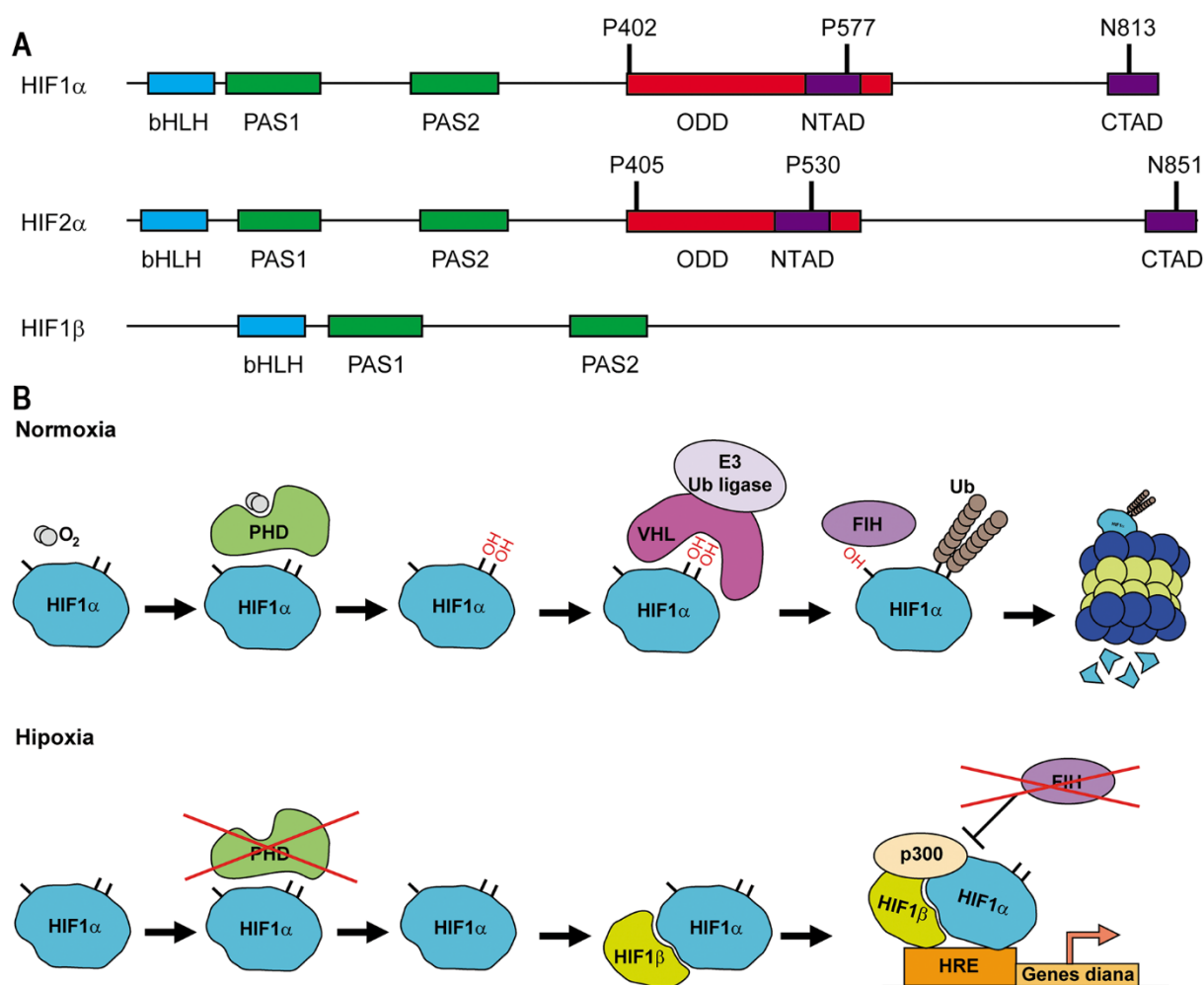


Figura 4 - Estructura y regulación de los factores HIF

A) Estructura de los dominios proteicos de HIF1 α , HIF2 α y HIF1 β . Las subunidades α y β interaccionan entre sí mediante los dominios bHLH y PAS. Además, HIF α cuenta con un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), donde se localizan las prolina susceptible de hidroxilación (P402 y P557 en HIF1 y P405 y P530 en HIF2). También cuenta con dos dominios de transactivación (TAD) para la unión de activadores de la transcripción, uno dentro del ODD (NTAD) y otro en el extremo C-terminal (CTAD), donde se localiza la asparagina hidroxilada por los factores FIH (N813 en HIF1, N851 en HIF2). **B)** Esquema de regulación canónica por oxígeno de HIF1 α . En normoxia, la hidroxilación mediada por las PHDs sirve como marca de reconocimiento para VHL. De este modo, la subunidad α es poliubiquitilada y degradada en el proteasoma. En condiciones de hipoxia, no se produce la hidroxilación y HIF1 α dimeriza con HIF1 β . El complejo se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), activando la expresión de los genes diana tras reclutar al co-activador transcripcional p300. La unión de p300 se inhibe por la hidroxilación mediada por FIH.

Esta función no se limita sólo a los factores HIFs, sino que existen otras proteínas reguladas de forma dependiente de oxígeno por las PHDs, como ATF4, IKK β o β -arrestina entre otras (Myllyharju, 2013). Las tres isoenzimas poseen propiedades diferentes, atendiendo a su patrón de expresión, regulación y preferencias de hidroxilación sobre las distintas isoformas de los factores HIF. Así, mientras que PHD2 se expresa de forma ubicua, PHD1 se expresa principalmente en la placenta y PHD3 es más específica de corazón (Myllyharju, 2013). Además, las tres se expresan por igual en riñón (Li y cols., 2007). PHD2 es la principal reguladora de HIF1 α , como demuestra el trabajo de Berra y colaboradores, en el cual el silenciamiento de PHD2 es suficiente para estabilizar HIF1 α en normoxia, mientras que el silenciamiento de PHD1 o PHD3 no lo consigue (Berra y cols., 2003). Este hecho también se refleja en los distintos

modelos de delección global de cada una de las tres isoenzimas. Mientras que los mutantes globales de *Phd1* y *Phd3* son viables y no presentan defectos aparentes, la delección global de *Phd2* causa defectos placentarios y letalidad embrionaria entre E12.5 y E14.5 (Takeda y cols., 2006). Además, mientras que PHD2 hidroxila preferentemente HIF1 α , PHD3 muestra preferencia por HIF2 α (Appelhoffl y cols., 2004). Por otro lado, tanto PHD2 como PHD3 se inducen en hipoxia (Epstein y cols., 2001), y son targets de HIF1 α (del Peso y cols., 2003), estableciéndose así un sistema de retroalimentación negativa que asegura la rápida degradación de HIF α una vez reestablecidos los niveles normales de oxígeno (reoxigenación).

También existen mecanismos de regulación de PHDs independientes de oxígeno. Por ejemplo, el óxido nítrico inhibe la función de las PHDs en normoxia por competición directa por el catión Fe²⁺ (Berchner-Pfannschmidt y cols., 2010). Además, los niveles de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs como el fumarato y el succinato modulan su actividad, ya que pueden alterar la disponibilidad de 2-oxoglutarato, que funciona como co-sustrato en la reacción de hidroxilación (Isaacs y cols., 2005; Selak y cols., 2005). Adicionalmente, la mitocondria también puede actuar como reguladora de las PHDs, a través de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Klimova y Chandel, 2008).

2.3 von Hippel-Lindau

Si bien tal y como se ha mencionado antes VHL es un componente clave en la regulación negativa de los factores HIF, existen numerosas evidencias que señalan otras funciones de VHL independientes de la ruta de hipoxia. Entre ellas cabe destacar el papel de VHL sobre la regulación de la matriz extracelular (Ohh y cols., 1998), senescencia (Young y cols., 2008), apoptosis (Guo y cols., 2009), estabilidad de microtúbulos (Hergovich y cols., 2003), estabilidad de ARN (Datta y cols., 2005), transcripción (Mikhaylova y cols., 2008) o deposición de matriz extracelular (Feijoo-Cuaresma y cols., 2008). Curiosamente, muchas de estas funciones son llevadas a cabo mediante estabilización de las proteínas sustrato, en lugar de por la actividad ubiquitin-ligasa de VHL. Esta observación apunta a la idea de que VHL es una proteína adaptadora que, dependiendo de qué otros factores lleve unidos, puede promover degradación o estabilización de sus proteínas diana (Hsu, 2012).

Por otra parte, el papel supresor de tumores de VHL hace que mutaciones en este gen están implicadas en varias patologías humanas. Por ejemplo, la enfermedad de von Hippel-Lindau, provocada por una mutación en línea germinal caracterizada por la aparición de carcinoma renal de célula clara, hemangioblastoma, feocromocitoma, tumores pancreáticos y eritrocitosis (Kaelin, 2007), o la enfermedad de Chuvash, causada por la mutación 598C>T en homocigosis, que cursa con el desarrollo de policitemia (Ang y cols., 2002).

2.4 Hipoxia, factores HIF y desarrollo cardiaco

Durante la formación del corazón se ha descrito la existencia de zonas cardiacas con niveles de oxígeno inferiores respecto a otras estructuras embrionarias, así como expresión tanto de *Hif1a* como de *Hif2a* y *Hif1b* (Aitola y Pelto-Huikko, 2003; Jain y cols., 1998; Lee y cols., 2001; Xu y cols., 2007), lo cual sugiere un posible papel fisiológico de la hipoxia y los factores HIF durante la cardiogénesis. Si bien el ARNm de estos tres genes está presente desde E9 hasta P1 (Aitola y Pelto-Huikko, 2003), la proteína de HIF1 α se detecta principalmente en células ventriculares y en los cojines endocárdicos (Guimaraes-Camboa y cols., 2015; Krishnan y cols., 2008), mientras que HIF2 α está presente sobre todo en las células endoteliales del corazón en desarrollo (Menéndez-Montes y cols., datos no publicados) y HIF1 β se expresa de forma ubicua a bajos niveles (Dunwoodie, 2009). Además, se ha descrito la participación de la hipoxia en la aparición y evolución de numerosas patologías cardiovasculares como la hipertensión pulmonar o la arteriosclerosis (Semenza, 2014).

La generación y caracterización de modelos genéticos de delección global o condicional en determinados tipos celulares cardiacos ha contribuido a explorar la participación de la ruta de hipoxia en la formación del corazón, así como a indagar en los mecanismos moleculares por los que la señalización PHD/VHL/HIF interviene en distintos procesos de la cardiogénesis de mamíferos. Sin embargo, existe gran controversia entre los modelos existentes y el papel definitivo de la ruta de hipoxia durante la formación del corazón todavía no está bien definido.

2.4.1 Modelos globales de delección

Existen diversos modelos de delección global de componentes de la ruta de respuesta a hipoxia. Sin embargo, estos modelos globales presentan, por lo general, letalidad embrionaria temprana asociada a defectos severos en el sistema vascular, o de la placenta. Si bien estos modelos presentan alteraciones graves del corazón, es complejo determinar si son efectos primarios o secundarios a estas otras alteraciones vasculares mencionadas. La temprana letalidad de los modelos (E10.5-11.5), limita el estudio detallado de la función de los factores HIF en etapas posteriores del desarrollo del corazón usando estos modelos.

2.4.1.A Modelos de delección global de *Hif1a*

Hasta la fecha, existen tres modelos publicados de delección global de *Hif1a* en ratón. El primer modelo, descrito por Ryan y colaboradores en 1998 (Ryan y cols., 1998), presenta parada de desarrollo del corazón en la etapa del giro, hipoplasia, disminución del número de trabéculas y de células endoteliales. Los embriones mutantes homocigotos mueren a E10. Otro modelo posterior, descrito por Compennolle y colaboradores en 2003 (Compennolle y cols., 2003), recapitula el mismo fenotipo. Además, en este caso los autores también describen defectos en la migración de las células de la cresta neural cardíaca.

De nuevo, la delección de *Hif1a* provoca letalidad embrionaria en torno a E10. En ambos casos, los autores describen defectos extracardiacos en procesos de angiogénesis, como la marcada reducción en la vasculatura cefálica que presentan estos embriones deficientes en *Hif1a*.

Existe un tercer modelo, propuesto por Iyer y colaboradores (Iyer y cols., 1998) en el cual, si bien se recapitulan los fenotipos de letalidad y parada del desarrollo, los embriones mutantes homocigotos presentan hiperplasia ventricular. El origen de esta discrepancia no está claro, si bien se ha propuesto que el casete de selección por neomicina bajo el control del promotor PGK (fosfoglicerato quinasa, del inglés *phosphoglycerate kinase*) presente en este último modelo podría influir en el fenotipo de hipertrofia descrito (Dunwoodie, 2009). Por otro lado, estos embriones también presentan fallos de cierre del tubo neural, así como defectos vasculares similares a los descritos en los modelos anteriores.

2.4.1.B Modelos de delección global de *Hif1b*

El principal modelo de delección global de *Hif1b* es el descrito por Adelman y colaboradores en 2000 (Adelman y cols., 2000). Los autores describen que los embriones mutantes homocigotos presentan hipoplasia ventricular, reducción de los cojines endocárdicos, vasculatura anormal del saco embrionario y defectos placentarios. Estos embriones mueren en torno a E10.5.

2.4.1.C Modelos de delección global de *Hif2a*

Se han descrito dos modelos globales de delección de *Hif2a* en ratón. En el primero de ellos, Tian y colaboradores describen alta expresión del gen en células del linaje simpatoadrenal entre E11.5 y E12.5 (Tian y cols., 1998). Los embriones mutantes homocigotos presentan disminución de la producción de noradrenalina a E12.5, bradicardia progresiva y muerte embrionaria entre E12.5 y E15.5, debido al fallo en la homeostasis de las catecolaminas.

Otro estudio posterior, llevado a cabo por Pen y colaboradores, demuestra un papel adicional de HIF2 α en la formación de la vasculatura embrionaria. Los autores describen defectos vasculares severos tanto en el propio embrión como en el saco embrionario (Peng y cols., 2000). Si bien la formación de nuevos vasos mediante procesos de vasculogénesis tiene lugar de forma correcta, la fusión entre ellos y el remodelado para formar vasos de mayor tamaño es defectuosa, provocando la muerte de los embriones entre E9.5 y E13.5. La diferencia en el fenotipo de estos dos modelos ha sido explicada por el uso de distintos fondos genéticos para generar los mutantes.

2.4.1.D Modelos de delección global de *Vhl*

En 1997, Gnarr y colaboradores generaron por primera vez un modelo murino de delección global de *Vhl*. En su estudio, los autores describen que los embriones mutantes en homocigosis presentan un desarrollo normal hasta E9.5. Sin embargo, a partir de ese punto se observan distintas alteraciones

placentarias y vasculares, que originan la muerte de estos embriones en torno a E10.5-E12.5 (Gnarra y cols., 1997).

2.4.2 Modelos condicionales cardiacos de delección

El desarrollo de la tecnología Cre-LoxP y la creación de alelos floxed para *Hif1a* y *Vhl* han permitido el desarrollo de modelos de delección condicionales y/o inducibles para el estudio de la función de los factores HIF en el desarrollo cardiaco. Sin embargo, los estudios existentes, además de mostrar ciertas discrepancias en cuanto a fenotipo de los embriones mutantes, en parte debido al uso combinado de una delección constitutiva en línea germinal y otra floxeada en corazón, en la mayoría de los casos no hacen distinción entre las diferentes capas del miocardio embrionario (compacto frente a trabeculado) y no profundizan en los aspectos moleculares subyacentes a las alteraciones cardiacas. Esto hace que, si bien los modelos basados en el uso de Cre recombinasa permiten eludir el problema de la letalidad temprana y posibles defectos cardiacos secundarios a fallos vasculares o placentarios previos de los modelos de delección global, todavía exista una gran falta de información en el campo en cuanto a los procesos de la cardiogénesis regulados por hipoxia a nivel celular y molecular.

2.4.2.A Modelos condicionales cardiacos de *Hif1a*

El primer modelo murino de delección condicional de *Hif1a* en corazón embrionario (Huang y cols., 2004) empleó el alelo floxeado de *Hif1a* en el exón 2, descrito por Ryan y colaboradores (Ryan y cols., 2000) en combinación con una Cre recombinasa específica de corazón, *Mlc2v-Cre*, que se expresa en el miocardio tanto compacto como trabeculado, pero de manera heterogénea. Los ratones homocigotos positivos para la Cre (*Hif1a^{fl/fl}/Mlc2v^{Cre/+}*) nacen en las frecuencias esperadas y no presentan fibrosis ni pérdida de cardiomiocitos. Sin embargo, la función cardiaca está disminuida y se observa hipertrofia del VI y del SIV, disminución de la microvasculatura, fallo en la recaptación del Ca^{2+} citosólico durante la diástole y disminución de la contractilidad a nivel celular. Además, estos ratones presentan alteraciones metabólicas consistentes en la disminución de la expresión de genes glucolíticos y un menor contenido en ATP, lactato y compuestos de fósforo de alta energía. Los autores proponen que HIF1 α juega un papel fundamental como sensor, adaptando la expresión de genes implicados en aporte de oxígeno, obtención de energía y metabolismo a la carga de trabajo del corazón adulto.

Otro modelo posterior, descrito por Krishnan y colaboradores en 2008 (Krishnan y cols., 2008), emplea un abordaje similar, mediante el empleo de *Mlc2v-Cre*, pero con una copia del gen *Hif1a* nula, delecionada en línea. En este caso, los embriones mutantes mueren en torno a E12.0. A E10.5 los mutantes presentan una cámara ventricular común, fusionada con las aurículas y con una marcada hiperplasia, aumento de expresión de genes pro-proliferativos (*Ccnd1* y *Cdk4*) e inhibición de expresión de genes implicados en bloqueo del ciclo celular (*Cdkn1a* o p21 y *Cdkn1b* o p27). Además, la expresión de genes cardiacos esenciales en desarrollo (*Nkx2.5*, *Tbx5*, *Mef2c* y Titina) se encuentra inhibida. Los

autores proponen un modelo en el cual la hipoxia actúa como una señal fisiológica que induciría la acumulación de HIF1 α y que mantendría la expresión de genes esenciales para la cardiogénesis.

El mismo autor empleó también el mismo modelo que Huang y colaboradores (evitando una delección en línea germinal) para estudiar el efecto de la pérdida de *Hif1a* en la etapa adulta (Krishnan y cols., 2009). Los autores demuestran el papel de HIF1 α y su colaboración con PPAR γ (Receptor y Activado por el Factor de Proliferación de Peroxisomas, del inglés *Peroxisome Proliferator-activated Receptor* γ) en la reprogramación metabólica responsable del desarrollo de hipertrofia cardíaca tras constricción de la aorta torácica: la delección de *Hif1* previene el desarrollo de hipertrofia y la acumulación de triacilglicéridos en este contexto. Demuestran así que la activación glucolítica mediada por HIF1 α es necesaria para la conversión de glucosa en lípidos y la activación de la síntesis de glicerofosfolípidos mediada por PPAR γ .

Sin embargo, un estudio reciente de Guimarães-Camboa y colaboradores (Guimarães-Camboa y cols., 2015) sugiere un efecto de la delección de *Hif1a* opuesto. En este estudio, mediante el empleo de un alelo de *Hif1a* nulo en línea germinal en combinación con otro floxeado usando una línea de ratón *Nkx2.5-Cre*, con recombinación a nivel de progenitor cardíaco en torno a E7.0-E7.5, los autores muestran un fenotipo de letalidad embrionaria en torno a E15.5. Los embriones mutantes presentan defectos en el SIV y un marcado adelgazamiento de las paredes ventriculares. A través de experimentos de ChIP-Seq y diversos análisis bioinformáticos, los autores proponen que la delección de *Hif1a* en progenitores *Nkx2.5* inhibe la proliferación de cardiomiocitos a través de la activación de rutas de estrés celular, principalmente vía P53 y ATF4.

2.4.2.B Modelos condicionales cardíacos de *Vhl*

En 2008, Lei y colaboradores (Lei y cols., 2008) emplean la línea *Mlc2v-Cre* en combinación con el alelo *Vhl floxed* previamente generado por el grupo de Rudolf Jaenisch (Haase y cols., 2001). Los ratones mutantes obtenidos no presentan letalidad. Sin embargo, a los 5 meses de edad, estos animales desarrollan dilatación ventricular, pérdida de función cardíaca y un aumento en la incidencia de aparición de tumores cardíacos. Además, ultraestructuralmente presentan degeneración de miocitos, acumulación de lípidos, rarefacción de miofibrillas y aumento de mitofagosomas. Los autores proponen que la elevación mantenida de HIF1 α a causa de la delección de *Vhl* sería la principal causa del fenotipo observado, especialmente en lo referente al metabolismo lipídico anormal y la mitofagia.

Posteriormente, otros autores han sugerido que parte del fenotipo observado por Lei y colaboradores podría tener un origen embrionario. En su trabajo de 2014, Neary y colaboradores (Neary y cols., 2014) observaron que los ratones *Vhl/aMHC-Cre* presentan alteraciones en la función cardíaca y en el número de mitocondrias en etapas finales de la gestación (E18.5), lo cual podría condicionar el fenotipo adulto descrito anteriormente.

3 METABOLISMO CARDIACO

El corazón presenta una alta demanda energética, para poder sustentar la continua contracción del miocardio. Sin embargo, presenta escasas reservas de fosfatos de alta energía, por lo que el acoplamiento entre la producción de ATP y la contracción es esencial para la correcta función cardíaca (Stanley y cols., 2005). Para ello, el corazón puede utilizar multitud de sustratos metabólicos para la producción de energía, incluyendo ácidos grasos, glucosa, lactato, aminoácidos y cuerpos cetónicos (Kolwicz y cols., 2013). Una parte fundamental en la maduración del miocardio de la etapa embrionaria a la postnatal y adulta consiste en el establecimiento de un sistema metabólico basado principalmente en la oxidación mitocondrial de sustratos altamente energéticos que garantice un aporte suficiente de ATP para mantener una contracción efectiva.

3.1 Sustratos metabólicos en el corazón

3.1.1 Ácidos grasos

El corazón presenta una baja capacidad de síntesis de lípidos *de novo*, así como una baja capacidad de almacenamiento de los mismos. Por ello, depende de los aportados por la circulación sanguínea, principalmente ácidos grasos (AG) unidos a albúmina y triacilglicéridos (TAG) (Wang y cols., 1998).

La entrada de lípidos en el cardiomiocito puede producirse a través de 3 mecanismos: (1) por difusión pasiva (Richieri y cols., 1993), (2) a través del receptor de albúmina (Hütter y cols., 1984), y (3) a través de un sistema de transporte transmembrana, que involucra proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, del inglés *Fatty Acid Binding Protein*) y translocasas (CD36 o FAT, del inglés *Fatty Acid Translocator*) que estimulan la disociación de la albúmina y la interacción de los AG con el transportador (FATP, del inglés *Fatty Acid Transport Protein*) (Koonen y cols., 2005). Finalmente, la FABP citoplasmática transfiere los AG a la membrana mitocondrial externa, donde la Acil-CoA sintasa de cadena larga (ACSL) los transforma en Acil-CoA de cadena larga (CL-Acil-CoA) (Coe y cols., 1999) (Fig. 5).

La entrada de los CL-Acil-CoA en la mitocondria se produce a través de la carnitina palmioiltransferasa (CPT). Existen dos isoformas codificadas por dos genes diferentes *Cpt1* y *Cpt2* (Bonnet y cols., 1999). CPT1 transforma los CL-Acil-CoA en acilcarnitina de cadena larga, liberando este último producto en el espacio intermembrana mitocondrial (Fraser y cols., 1997), donde la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) lo transporta a la matriz mitocondrial. En la matriz, CPT2 lleva a cabo la reacción opuesta a CPT1, liberando carnitina y CL-Acil-CoA, que se oxidan a través de la beta-oxidación (Bonnet y cols., 1999) (Fig. 5).

3.1.1.A Regulación del metabolismo de ácidos grasos

El principal punto de regulación se ejerce a nivel de CPT1, controlando la entrada de ácidos grasos en la mitocondria. CPT1 es sensible a los niveles de malonil-CoA, que actúa como inhibidor de la transferasa. Los niveles de malonil-CoA están controlados por la acción de dos enzimas: la acetil-CoA carboxilasa, que sintetiza malonil-CoA, y la malonil-CoA decarboxilasa, que lo degrada (King y cols., 2005).

3.1.2 Glucosa

El primer paso para que la glucosa sea metabolizada por el cardiomiocito es su entrada en la célula, mediante los transportadores de glucosa (GLUT). Existen varias isoformas, de las cuales las predominantes en corazón son GLUT1 y GLUT4 (Gould y Holman, 1993). GLUT1 se expresa principalmente durante estadios embrionarios, mientras que GLUT4 predomina en la etapa adulta y es sensible a insulina (Lopaschuk y Jaswal, 2010; Santalucia y cols., 1992). La asimilación de una molécula de glucosa a través de la glucólisis genera dos moléculas de piruvato. Este piruvato puede tener distintos destinos, en función del programa metabólico establecido en el cardiomiocito: (1) entrada en mitocondria y conversión en Acetil-CoA (AcCoA), (2) conversión anaeróbica de piruvato en lactato o (3) reabastecer el ciclo de Krebs a través de reacciones anapleróticas (Gibala y cols., 2000) (Fig. 5).

3.1.2.A Entrada de piruvato en la mitocondria

El piruvato atraviesa la membrana mitocondrial externa a través del transportador de ácidos monocarboxílicos 1 (MCT1, del inglés *MonoCarboxylic acid Transporter 1*), codificado por el gen *Slc16a1*). En la membrana mitocondrial interna, el complejo enzimático Piruvato Deshidrogenasa (PDH) cataliza la conversión irreversible de piruvato y Coenzima A (CoA) a Acetil-CoA (AcCoA) y CO₂, generándose una molécula de NADH en el proceso. La reacción catalizada por el complejo de la PDH está estrechamente regulada mediante un proceso de fosforilación-defosforilación. Por un lado, la PDH fosfatasa defosforila la PDH, aumentando su actividad. Por otro, la PDH quinasa (PDK) inhibe la PDH por fosforilación en respuesta al aumento de los niveles de AcCoA y NADH (Stanley y cols., 2005) (Fig. 5).

3.1.2.B Conversión de piruvato en lactato

En situaciones en las que el piruvato no puede metabolizarse por vía mitocondrial, por ejemplo, en situaciones de isquemia o en células cancerígenas que realizan glucólisis aerobia (efecto Warburg (Warburg, 1956)), es necesario regenerar los niveles de NAD⁺ para que la glucólisis no se detenga. Para ello, el piruvato se oxida a lactato mediante la acción del enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), regenerándose una molécula de NAD⁺. El lactato se elimina de la célula principalmente a través de MCT4 (Slc16a4), localizado en la membrana plasmática y con mayor afinidad por lactato que MCT1 (Bonen, 2001; Hong y cols., 2016) (Fig. 5).

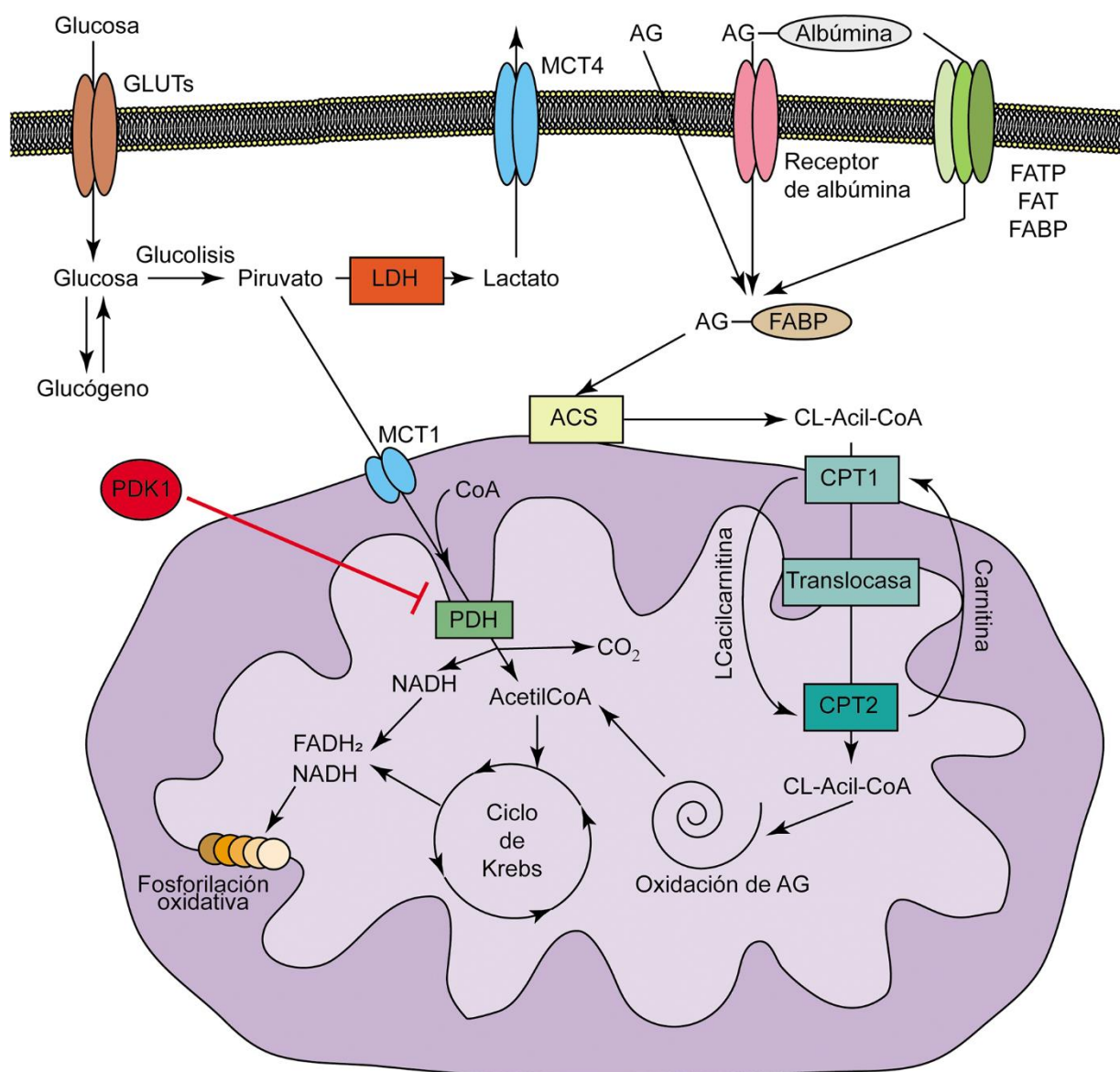


Figura 5 - Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos en cardiomiocitos

La glucosa entra en la célula a través de los transportadores de glucosa (GLUTs). Esta glucosa puede ser empleada en la síntesis de glucógeno o puede convertirse en piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se convierte en lactato mediante la lactato deshidrogenasa (LDH) y sale de la célula a través de los transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT). El piruvato también puede entrar a la mitocondria por los MCT y convertirse en Acetil-CoA a través de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Este paso es inhibido por la acción de la PDH quinasa (PDK1). Por otro lado, los ácidos grasos (AG) entran en la célula a través del receptor de albúmina o a través del sistema que involucra la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), la translocasa de ácidos grasos (FAT) y la proteína de unión de ácidos grasos (FABP). Los AG son convertidos en acil-CoA de cadena larga (CL-Acil-CoA) por la acilCoA sintasa (ACS). Estos CL-Acil-CoA se transportan a la matriz mitocondrial a través del sistema carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2 (CPT1 y CPT2) y se convierten en Acetil-CoA a través de la oxidación de AG. El Acetil-CoA obtenido por ambas vías se incorpora al ciclo de Krebs para proporcionar NADH y FADH₂, que proporcionan el poder reductor necesario para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

3.1.2.C Rutas anapleróticas del piruvato

Una reacción o un proceso anaplerótico es aquel que genera metabolitos que reabastecen directamente al Ciclo de Krebs, o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (CAT) (Gibala y cols., 2000), asegurando un continuo aporte de intermediarios necesarios para regenerar el poder reductor de la célula. El piruvato

puede actuar como metabolito anaplerótico por varias vías: (1) conversión en malato, mediante el enzima málico (ME1, ME2) (Malloy y cols., 1990), (2) conversión en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC) (Malloy y cols., 1990) y (3) servir como co-sustrato del glutamato en su transaminación a alanina por la alanina aminotransferasa (ALT), generando α -cetoglutarato (Kodde y cols., 2007).

3.1.3 Aminoácidos

El catabolismo de los aminoácidos en el corazón es especialmente importante en situaciones de disponibilidad limitada de oxígeno (Bing y cols., 1954; Julia y cols., 1990), al inhibirse la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y restringirse la entrada de piruvato a mitocondria por acción de la PDK1. Los aminoácidos pueden ser metabolizados sin contribuir a la acidificación del medio intracelular como ocurre con el lactato y no requieren oxidación ni conversión glucolítica (Sambandam y cols., 2002). Además de ser empleados fisiológicamente, también se les han atribuido funciones en el corazón inmaduro, como incrementar su tolerancia al daño isquémico (Julia y cols., 1990), especialmente en el caso de los aminoácidos de cadena ramificada (Schwartz y cols., 1985).

La principal característica de los aminoácidos desde el punto de vista metabólico es su capacidad de aportar intermediarios del ciclo de Krebs, a través de distintas vías, esquematizadas en la Figura 6.

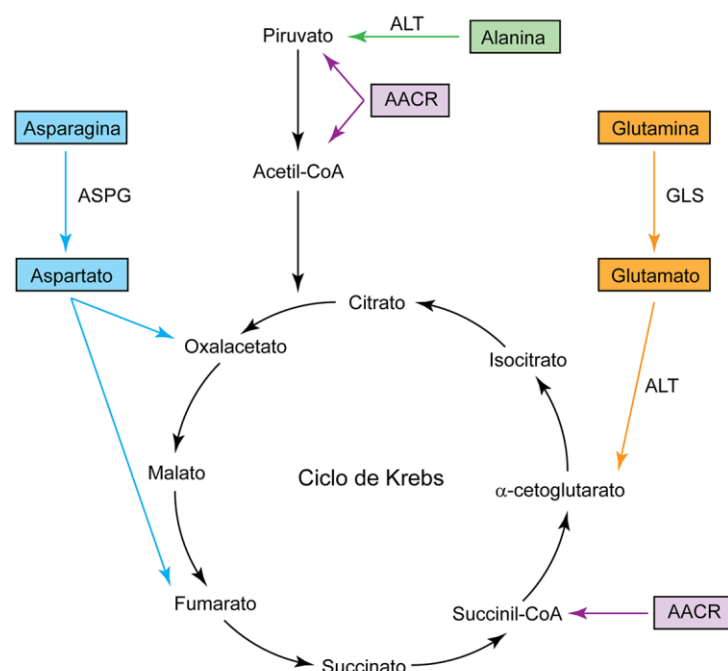


Figura 6 - Vías anapleróticas de los aminoácidos

El glutamato y la glutamina pueden convertirse en α -cetoglutarato por transaminación (color naranja). Por otro lado, el aspartato y la asparagina se incorporan al ciclo por transaminación a oxalacetato o a nivel de fumarato a través del ciclo de la urea (color azul). La alanina puede convertirse en piruvato por transaminación (color verde). Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) contribuyen al ciclo de Krebs, tras sufrir diversas modificaciones, a nivel de succinil-CoA, Acetil-CoA o piruvato (color morado). ALT: Alanina aminotransferasa, ASPG: Asparaginasa, GLS: Glutaminasa

- ✦ **Glutamato y glutamina:** La glutamina se convierte en glutamato por acción de la glutaminasa (GLS). El glutamato, junto con el piruvato, genera α -cetoglutarato y alanina a través de la Alanina aminotransferasa (ALT) (Bolotin y cols., 2007). Además, también puede generar succinato, NADH y ATP a través de un proceso de fosforilación a nivel de sustrato, que no requiere oxígeno (Drake y cols., 2013).

- ✦ Aspartato y asparagina: La asparagina se transforma en aspartato a través de la asparaginasa (ASPG). El aspartato puede generar oxalacetato por transaminación mediada por la Aspartato aminotransferasa (AST) (Gibala y cols., 2000) o bien entrar en el ciclo de Krebs a nivel del fumarato, a través del ciclo de la urea.
- ✦ Aminoácidos de cadena ramificada: La valina, la leucina y la isoleucina pueden generar AcCoA, piruvato y succinilCoA (Schwartz y cols., 1985). Por otro lado, también pueden participar en procesos de transaminación junto con el α -cetoglutarato, generándose glutamato y el α -cetoácido correspondiente (Peuhkurinen y cols., 1983).

3.2 Metabolismo y desarrollo embrionario

El metabolismo glucolítico está asociado con una alta capacidad proliferativa (Lopaschuk y Jaswal, 2010), ya que permite la obtención rápida de monómeros para la biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos que sustentan la alta tasa mitótica (Vander Heiden y cols., 2009). A medida que el proceso de diferenciación progresa y la capacidad proliferativa disminuye, la obtención de energía mediante el metabolismo oxidativo mitocondrial adquiere una importancia creciente. Este cambio metabólico, que permite adaptar el metabolismo a las nuevas funciones celulares, es un paso esencial para la diferenciación de células madre en cardiomiocitos *in vitro* (Chung y cols., 2011).

3.2.1 Metabolismo en el corazón embrionario

Diferentes estudios han demostrado que la principal característica del corazón embrionario, desde el punto de vista metabólico, es su alta dependencia de la glucólisis para la proliferación y generación de ATP (Chung y cols., 2010), en contraste con el metabolismo cardíaco en el adulto, basado principalmente en la oxidación mitocondrial de AG con mayor aporte de energía acorde a la alta demanda contráctil del miocardio maduro (Lopaschuk y Jaswal, 2010). Es más, la contribución de la oxidación de AG al aporte energético total es reducida en corazones embrionarios (Lopaschuk y Spafford, 1990). Este hecho se explica, al menos en parte, por el bajo contenido en AG que presenta la sangre fetal (Ferré y cols., 1986). Estas observaciones, unidas al retardo en la maduración de las enzimas asociadas al transporte y oxidación de AG, así como a la deficiencia en carnitina en el corazón inmaduro, han llevado a plantear la hipótesis de que la glucólisis es esencial durante el desarrollo cardíaco (Ostadal y cols., 1999).

La diferencia en los programas metabólicos entre el corazón embrionario y el corazón adulto sugiere la existencia de un cambio metabólico que permita adaptar un metabolismo basado en la glucólisis a un metabolismo mitocondrial basado en la oxidación de ácidos grasos. Se ha descrito que, en ratón, esta transición tiene lugar en torno al nacimiento y los primeros días de vida, observándose un cambio metabólico postnatal de glucólisis a oxidación de ácidos grasos, asociado a un descenso en la expresión de enzimas glucolíticas y un aumento en la expresión de genes de enzimas del ciclo de Krebs y de la

oxidación de ácidos grasos, acompañado además de un incremento significativo del contenido mitocondrial (Puente y cols., 2014). Si bien estos cambios se han relacionado con un aumento en los niveles de oxígeno de la etapa fetal a la postnatal, no se conocen los mecanismos moleculares que lo regulan ni qué papel juegan la hipoxia o los factores HIF en la regulación del metabolismo cardiaco.

3.3 Factores HIF y regulación del metabolismo

Es un hecho reconocido y ampliamente estudiado que HIF1 es un importante regulador del metabolismo celular, tanto en contextos fisiológicos como patológicos (Majmundar y cols., 2010). Células madre embrionarias con ambos alelos de *Hif1a* inactivados presentan niveles reducidos de expresión de transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas (Semenza y cols., 1999). De hecho, HIF1 media una respuesta adaptativa esencial a situaciones de hipoxia: el cambio metabólico desde un metabolismo oxidativo, basado en la mitocondria, a un metabolismo no oxidativo basado en la glucólisis anaeróbica (Majmundar y cols., 2010). Además de la activación de enzimas glucolíticas, HIF1 activa la expresión del gen *Pdk1*, incrementando, por tanto, la inhibición de la PDH y reprimiendo la entrada de piruvato en la mitocondria (Kim y cols., 2006). A nivel mitocondrial, HIF1 media un cambio de isoforma de COX4-1 a COX4-2. COX4-2 presenta menor actividad que COX4-1, pero mayor eficacia en la transferencia de electrones al oxígeno, reduciendo los niveles de ROS en situaciones de hipoxia (Fukuda y cols., 2007). Por otro lado, HIF2 también juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo, promoviendo la homeostasis redox y la viabilidad celular en múltiples contextos. HIF2 activa la expresión de enzimas antioxidantes, entre ellas la superóxido dismutasa 2 (SOD2), reduciendo los niveles de ROS (Gordan y cols., 2007). Además, también está implicado en la regulación del metabolismo lipídico, inhibiendo la expresión de genes involucrados en la oxidación de AG como *Acs1* o *Cpt1*, y promoviendo su almacenamiento (Rankin y cols., 2009).

No obstante, si bien el papel de los factores HIFs en la regulación del metabolismo celular es ampliamente conocido en diversos contextos, especialmente en células tumorales, no existe mucho conocimiento acerca del papel que pueden jugar en la regulación del metabolismo de los cardiomiocitos *in vivo*. Por otro lado, los estudios previos realizados a nivel metabólico en embriones y neonatos de diversas especies, así como de mutantes de la ruta de respuesta a hipoxia, tratan al corazón embrionario como un todo, sin distinguir entre diferentes tipos celulares o estructuras dentro del corazón como el miocardio compacto (MC) o las trabéculas. Todo ello, unido al hecho de que el desarrollo embrionario y la cardiogénesis tienen lugar en condiciones de bajo oxígeno (Lee et al., 2001), sugiere que la ruta controlada por los factores HIF puede jugar un papel importante durante el desarrollo cardiaco, tanto a nivel directo como a nivel metabólico. Sin embargo, pese a los modelos descritos, todavía existe una falta de conocimiento en cuanto a los detalles de los mecanismos moleculares regulados por hipoxia y la señalización de VHL/HIF en la formación del corazón y en la regulación de su metabolismo.

OBJETIVOS

Tal y como se ha mencionado en la introducción, existen evidencias experimentales que demuestran que el desarrollo embrionario transcurre en un ambiente hipóxico. Asimismo, se ha descrito que los modelos de delección de componentes de la ruta de respuesta a hipoxia, tanto globales como específicos de corazón, presentan alteraciones cardíacas durante el desarrollo embrionario, apuntando a un importante papel de esta ruta en el proceso de cardiogénesis. Sin embargo, existe una gran controversia entre los distintos modelos genéticos publicados, así como un conocimiento limitado acerca de los procesos regulados por HIF y los mecanismos moleculares por los que la hipoxia interviene en el desarrollo cardíaco.

A la vista de la información y resultados previos disponibles, hemos propuesto como principal objetivo de esta Tesis Doctoral:

Caracterizar el papel de los componentes de la respuesta a hipoxia VHL/HIF1 en los procesos de desarrollo y maduración del miocardio embrionario.

En concreto, mediante la generación de diversos modelos genéticos de ganancia y pérdida de función de la ruta de hipoxia en progenitores NKX2.5⁺ y cardiomiocitos TnTc⁺, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1)** Determinar el patrón de expresión de HIF1 α en las etapas centrales del desarrollo del corazón (E9.5-E14.5) y analizar su correlación con la programación metabólica del miocardio embrionario.
- 2)** Definir el papel de HIF1 en la regulación del metabolismo de la glucosa y la dinámica mitocondrial en las etapas centrales de la cardiogénesis.
- 3)** Caracterizar las consecuencias estructurales, fisiológicas y funcionales de la señalización deslocalizada de HIF1 tras la delección de *Vhl* en el miocardio embrionario.
- 4)** Analizar las alteraciones asociadas a la pérdida de *Hif1a*, incluyendo adaptaciones metabólicas, durante el desarrollo embrionario y la etapa adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MODELOS ANIMALES

1.1 Líneas de animales transgénicos y condiciones de estabulación

En este estudio se han empleado diferentes líneas de ratones modificados genéticamente, previamente descritas. Los animales *Vhl* floxed, con el exón 1 del gen flanqueado por sitios LoxP (Haase y cols., 2001), y *Hif1a* floxed, con el exón 2 del gen flanqueado por sitios LoxP (Ryan y cols., 2000), previamente descritos, fueron mantenidos en fondo genético C57BL/6 y en homocigosis. Hembras de estas líneas se cruzaron con machos de diferentes líneas C57BL/6 portadoras de Cre recombinasa en heterocigosis y el correspondiente gen floxed (*Vhl* o *Hif1a*): la línea *Nkx2.5*^{IRES^{Cre}}, que porta un casete IRES-Cre insertado en el extremo no traducido 3' del ARNm del gen *Nkx2.5* (Stanley y cols., 2002), o la línea transgénica *TnTc*-Cre, en la cual la expresión de la Cre recombinasa está controlada por el promotor del gen de la troponina cardiaca (*TnTc*, *Tnnt2*) de rata. Las hembras cruzadas de este modo fueron vigiladas para la formación de tapón vaginal, indicativo de cópula.

La línea doble *Vhl*^{f/f}/*Hif1a*^{f/f} se generó a partir de cruces de animales homocigotos *Vhl*^{f/f} por *Hif1a*^{f/f} y posteriormente fue llevada a homocigosis. Hembras dobles homocigotas se cruzaron por animales *Hif1a*^{f/f}/*Nkx2.5*^{+/^{Cre}} y se seleccionaron machos *Vhl*^{f/f}/*Hif1a*^{f/f}/*Nkx2.5*^{+/^{Cre}}. Estos machos se cruzaron por las hembras dobles homocigotas para cruces de análisis mediante la observación del tapón vaginal.

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, del inglés *specific pathogen free*) en el Animalario del CNIC. Todos los animales, tanto de producción como experimentales fueron mantenidos en condiciones ambientales, de estabulación, alimentación y bienestar de acuerdo a la Directiva Europea 2010/63EU y la Recomendación 2007/526/EC y el Real Decreto RD53/2013 del Gobierno de España. Adicionalmente, todos los experimentos, tanto con animales adultos como con embriones, fueron aprobados por el Comité Ético del CNIC.

1.2 Genotipado

Para el genotipado de ratones adultos se empleó el extremo final de la cola, cortado mediante cauterizador hemostático en el momento del destete (100S, Engel-Löter, Austria). En el caso del genotipado de embriones, se empleó el saco embrionario o la cola de los mismos. Para los controles de delección se empleó tejido ventricular embrionario. En todos los casos, el tejido se incubó en agitación durante toda la noche a 55°C en 600µL de solución de lisis (100mM Tris-HCl pH=8.5, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl) al que se le añadieron 4µL de proteinasa K (3115879001, Sigma-Aldrich, EEUU) a 20µg/µL (concentración final 0.16µg/mL). Al día siguiente, se añadieron 167µL de NaCl 5M (concentración final 1.08M) y se centrifugaron los tubos a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les añadió 700µL de isopropanol y se mezclaron por agitación.

A continuación, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70% seguido de una centrifugación a 14000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Tras dejar secar el precipitado completamente, se añadieron 100µL de agua destilada para resuspender el ADN.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20µL. A 10µL de mezcla comercial de PCR (K1082, Thermo Scientific, MA, EEUU) se añadieron 1µL de cada oligo a una concentración de 10µM (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) y 1µL del ADN extraído anteriormente, con las siguientes excepciones:

- Para el genotipado de *Vhl* y *Hif1a*, a la mezcla se le añadió 1µL de DMSO.
- Para el genotipado de *Nkx2.5*, se añadieron 0.66µL de cada uno de los tres oligos.

En todos los casos, el volumen final se ajustó a 20µL con agua destilada. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador (Verity 96-Well, Applied Biosystems, CA, EEUU). Tras completarse las reacciones, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa, al 1.5% en el caso de la PCR de *Nkx2.5*, *TnTc*, alelo nulo de *Vhl* y alelo nulo de *Hif1a* y al 3% en el caso de la PCR de *Vhl* y *Hif1a*. Las secuencias de los oligos, los programas de PCR empleados y los tamaños de los productos obtenidos se detallan en la Tabla 1.

Detección de alelos Cre		
	<i>Nkx2.5</i> -Cre	<i>TnTc</i> -Cre
Oligo directo	GCCCTGTCCCTCAGATTTCACACC	TACTCAAGAACTACGGGCTGC
	GCGCACTCACTTTAATGGGAAGAG	
Oligo reverso	GATGACTCTGGTCAGAGATACCTG	GCACTCCAGCTTGGTTCCCGA
Programa	5' 94º, 30 x (30" 94º, 30" 60º, 1' 72º) 10' 72º y mantener a 4ºC	3' 94º, 30 x (30" 94º, 30" 57º, 45" 72º) 6' 72º y mantener a 4ºC
Productos	Alelo silvestre: 264 pb Alelo Cre: 583 pb	Alelo silvestre: No producto Alelo Cre: 350 pb
Detección de alelos floxed		
	<i>Hif1a</i> floxed	<i>Vhl</i> floxed
Oligo directo	CGTGTGAGAAAATTCTGGATG	CGCGTCGTGCTGCCTTTGTG
Oligo reverso	AAAAGTATTGTGTTGGGGCAGT	TCTGTCTTGGCCTCCTGAGT
Programa	3' 94º, 30 x (30" 94º, 30" 57º, 45" 72º) 6' 72º y mantener a 4ºC	3' 94º, 35 x (30" 94º, 30" 57º, 45" 72º) 6' 72º y mantener a 4ºC
Productos	Alelo silvestre: 565 pb Alelo floxed: 615 pb	Alelo silvestre: 287 pb Alelo floxed: 460 pb

Detección de alelos nulos		
	<i>Hif1a</i> nulo	<i>Vhl</i> nulo
Oligo directo	GCCCATGGTAAGAGAGTAGGTGGG	CTGGTACCCACGAAACTGTC
Oligo reverso	AAAAGTATTGTGTTGGGGCAGT	CTGACTTCCACTGATGCTTGTCACAG
Programa	3' 94º, 35 x (30" 94º, 30" 57º, 45" 72º) 6' 72º y mantener a 4ºC	3' 94º, 35 x (30" 94º, 30" 57º, 45" 72º) 6' 72º y mantener a 4ºC
Productos	Alelo silvestre/floxed: 1213 pb Alelo nulo: 400 pb	Alelo silvestre/floxed: No producto Alelo nulo: 260 pb

Tabla 1 – Genotipado de las líneas de ratón empleadas

Para cada gen analizado por genotipado, la tabla recoge las secuencias de los oligonucleótidos empleados, el programa de PCR usado así como el tamaño de los productos esperados para cada alelo.

1.3 Inoculación de sustancias: pimonidazol y BrdU

1.3.1 Inoculación de pimonidazol

Para la detección de las regiones hipóxicas se empleó la sonda de hipoxia pimonidazol, disponible comercialmente como Hypoxyprobe Omni Kit (HP3-200Kit, Hypoxyprobe, MA, EEUU). Se disolvieron 200mg de pimonidazol en 13.34mL de PBS, obteniendo una concentración final de 15mg/mL. Se inyectaron 150mg de pimonidazol por vía intraperitoneal a las hembras gestantes. Tras 3h de marcaje, para asegurar la eliminación del pimonidazol circulante y evitar marcaje debido a la hipoxia *post mortem*, se procedió al sacrificio de las hembras y a la extracción de embriones.

1.3.2 Inoculación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)

Para la detección de las células proliferantes en fase S del ciclo celular se empleó el análogo de timina BrdU (B5002, Sigma-Aldrich, EEUU). El BrdU se disolvió en PBS para obtener una concentración final de 10mg/mL. Las hembras gestantes se inyectaron por vía intraperitoneal con 3mg de BrdU. Tras un tiempo de marcaje de 2h, se sacrificaron las hembras y se extrajeron los embriones como se indica en los siguientes apartados.

2 EXTRACCIÓN Y PROCESADO DE EMBRIONES Y TEJIDOS

2.1 Extracción de embriones

Las hembras gestantes fueron sacrificadas por sobredosis de CO₂ por inhalación. Tras comprobar la muerte del animal por ausencia de reflejos, se abrió la cavidad abdominal y se diseccionó el útero completo. En una placa con tampón fosfato (PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH=7.4) se separaron las deciduas y se retiraron el útero y las envolturas embrionarias.

2.1.1 Procesamiento de embriones para técnicas histológicas en parafina

Una vez extraídos los embriones, se procedió a su fijación. Previamente, para embriones de E14.5 en adelante, se cortó y descartó la cabeza y la parte inferior del cuerpo, para permitir una mejor fijación. Los embriones se fijaron durante toda la noche en agitación a 4°C en 4% PFA (RT15710, Electron Microscopy Sciences, PA, EEUU). Tras la fijación, los embriones se lavaron en PBS en agitación, se deshidrataron por inmersión en etanol al 70% y se incluyeron en parafina utilizando un procesador automático (ASP300, Leica, Alemania) configurado con el siguiente programa: Etanol 70% 30 minutos, Etanol 95% 1 hora (x2), Etanol 100% 1 hora (x3), xileno 30 minutos, xileno 1 hora (x2), parafina 45 minutos, parafina 1 hora (x2).

Los bloques obtenidos se almacenaron a 4°C y posteriormente se seccionaron a diferentes grosores (5 u 8 micras) en un micrótopo (RM2245, Leica, Alemania). Los cortes obtenidos se secaron durante toda la noche a 37°C y se conservaron a temperatura ambiente (técnicas histológicas y de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia) o a -20°C (técnicas de hibridación *in situ*).

2.1.2 Procesamiento de embriones para criosecciones frescas

Los embriones extraídos fueron orientados en un molde con Tissue-Tek O.C.T. Compound (4583, Sakura Finetek Europe, Holanda) y congelados rápidamente mediante inmersión en nitrógeno líquido entre 10 y 15 segundos. Los bloques obtenidos se conservaron a -80°C y se seccionaron en cortes de 10 micras de grosor mediante un criostato (CM1850, Leica, Alemania). Estos cortes se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.1.3 Procesamiento de embriones para técnicas de bioquímica y biología molecular

Una vez extraídos los embriones, se abrió el tórax y el corazón fue extraído. A continuación, para embriones de estadio E11.5 o superior, se eliminó la zona de las aurículas y la parte superior de los ventrículos para evitar la contaminación con tejido valvular. El tejido final se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido entre 10 y 15 segundos y se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

2.2 Extracción de corazón de ratón adulto

Los ratones adultos fueron sacrificados por sobredosis de CO₂ por inhalación. Tras comprobar la muerte del animal por ausencia de reflejos, se abrió la cavidad abdominal, se retiró el diafragma y se abrió la caja torácica, poniendo especial cuidado en no dañar ningún vaso sanguíneo de gran calibre. A continuación, se seccionó la vena hepática y los corazones fueron perfundidos a través del ventrículo derecho mediante punción con aguja de 21Ga con 1mL de solución de 0.3 M KCl y 1mL de 4% PFA. Finalmente, seccionaron los grandes vasos, se extrajo el corazón y se eliminaron los restos de tejido adiposo y otras estructuras no cardíacas en una placa con tampón PBS.

2.2.1 Procesamiento de corazones para técnicas histológicas en parafina

Los corazones aislados se fijaron durante 48 horas en agitación en a 4°C en 4% PFA (RT15710, Electron Microscopy Sciences, PA, EEUU). Tras la fijación, se lavaron en PBS en agitación, se deshidrataron por inmersión en etanol al 70% y se incluyeron en parafina utilizando un procesador automático (ASP300, Leica, Alemania) configurado con el mismo programa empleado en los embriones. Los bloques obtenidos se almacenaron a 4°C y se trataron de forma análoga al proceso descrito para los embriones.

2.2.2 Procesamiento de corazones para técnicas de bioquímica y biología molecular

Los corazones se extrajeron como se ha descrito sin realizar la perfusión con fijador. Una vez extraídos los corazones, en una placa con PBS colocada sobre hielo se eliminaron las aurículas, las conexiones con los grandes vasos y la parte superior de los ventrículos para eliminar la zona valvular. La porción ventricular resultante se troceó en fragmentos no mayores de 2mm. Este material se congeló por inmersión en nitrógeno líquido durante 10-15 segundos y se conservó a -80°C hasta su uso posterior.

2.3 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica

Los corazones se extrajeron sin perfusión con fijador. A continuación, en una placa con PBS colocada sobre hielo se diseccionó una porción de 2mm x 2mm aproximadamente del ventrículo izquierdo y se fijó durante toda la noche a 4°C en agitación en una disolución de PFA 4% Glutaraldehído 1%. Las muestras se lavaron durante todo el día siguiente en agitación con PBS a temperatura ambiente. Tras los lavados, las muestras se trataron con una solución 1% OsO₄ y se incluyeron en resina Durcupan (44610, Sigma-Aldrich, MO, EEUU). Tras la polimerización de la resina a 60°C, los bloques se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso. Las muestras se seccionaron a 60nm de grosor mediante un ultramicrotomo Ultracut S (Leica, Alemania). Las secciones resultantes se contratiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su visualización final.

3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.1 Tinción hematoxilina-eosina

Las secciones de 5µm de grosor se desparafinaron y tiñeron con Hematoxilina-Eosina en la Unidad de Histopatología del CNIC usando un teñidor automático (ST5020, Leica, Alemania) con el siguiente programa: xileno 3 minutos (x2), etanol 100% 2 minutos, etanol 96% 1 minuto, etanol 70% 1 minuto, agua destilada 2 minutos, hematoxilina de Harris 3 minutos, lavado en agua 2 minutos, 1% HCl 7 segundos, lavado en agua 5 minutos, 20% eosina 3 minutos, lavado final y deshidratación. Los portaobjetos teñidos se digitalizaron con un escáner NanoZoomer-XR Digital slide scanner (Hamamatsu, Japón).

3.2 Tinción Tricrómico de Masson

Las secciones de 5µm de grosor se desparafinaron y tiñeron con Tricrómico de Masson en la Unidad de Histopatología del CNIC empleando el siguiente protocolo: fijación en Bouin durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavado con agua seguido de hematoxilina de Weigert’s durante 2 minutos, tinción con rojo de Biebrich durante 3 minutos, diferenciación en 1% ácido fosfomolibdico 5 minutos, tinción con azul de anilina 3 minutos y tinción final con verde luz durante 1 minuto. Los portaobjetos teñidos se digitalizaron con un escáner NanoZoomer-XR Digital slide scanner (Hamamatsu, Japón).

3.3 Hibridación *in situ*

Solución	Componentes
Hibridación	50% Formamida 25% SSC 20X pH=5.5 1% Denhardt’s 100X 0.1% Tween20 0.1% Chaps 0.05mg/mL ARNt En agua miliQ
SSC 20x pH=5.5	3M NaCl 300mM Citrato Trisódico En agua miliQ
Denhardt’s 100X	2% Ficoll 2% Polivinilpirrolidona 2% Albúmina de Suero Bovino En agua miliQ
Post-hibridación I	50% Formamida 25% SSC 20X pH=5.5 1% SDS En agua miliQ
Post-hibridación II	50% Formamida 10% SSC 20X pH=5.5 0.2% SDS En agua miliQ
Bloqueo en MABT	2% Suero de Cabra 1% Reactivo de Bloqueo
MABT 5X	0.5M Ácido Maleico 0.75M NaCl 2.5% Tween20 En agua miliQ, pH=7.5
Fosfatasa Alcalina	0.12M NaCl 0.05M MgCl ₂ 0.1M Tris-HCl pH=9.5 0.1% Tween20 En agua miliQ

Secciones de embriones 10µm de grosor, almacenadas a -20°C, se secaron durante 30 minutos a 65°C. A continuación, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante lavados sucesivos en etanol en concentración decreciente (100%, 90%, 70%, 50% y 30%). Una vez hidratados, los cortes se post-fijaron en PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se expuso el ARNm mediante incubación con 0.01mg/mL de proteinasa K (3115879001, Sigma-Aldrich, MO, EEUU) a 37°C durante 10 minutos y se post-fijaron de nuevo con PFA al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se trataron con 0.7N HCl durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar proteínas enmascarantes.

Tabla 2 – Composición de las soluciones empleadas en la hibridación *in situ*

La tabla detalla, para cada solución empleada en el protocolo de la hibridación *in situ* (primera columna), los componentes y su concentración, así como el disolvente utilizado (segunda columna).

Finalmente, las secciones se bloquearon a 65°C durante 2 horas en solución de hibridación y se incubaron a 65°C durante toda la noche con la sonda correspondiente, marcada con digoxigenina (DIG), a una concentración final de 5µL/mL en solución de hibridación.

Al día siguiente se realizaron dos lavados, en condiciones astringentes decrecientes, de 30 minutos cada uno a 65°C con las soluciones de post-hibridación I y II. A continuación, las secciones se bloquearon con solución de bloqueo y se incubaron con fragmentos Fab anti-DIG conjugados a fosfatasa alcalina (1:2000 en solución de bloqueo; 11093274910, Roche, Suiza) durante toda la noche a 4°C.

Finalmente, al día siguiente las secciones se lavaron durante varias horas en MABT y se acondicionaron por incubación durante 20 minutos en solución de fosfatasa alcalina. Para el revelado se incubaron las secciones con BM-Purple (11442074001, Roche, Suiza) en periodos de 10-12 horas, con lavados en solución de fosfatasa alcalina entre ellos, a 37°C en oscuridad. El revelado se llevó a cabo durante 1-4 días, hasta apreciar una señal clara. Una vez terminado el revelado, las secciones se lavaron en agua destilada y se montaron con medio de montaje Aquatex (108562, Meck, NJ, EEUU). Las imágenes se adquirieron con un microscopio de campo claro Nikon 90i (Nikon, Japón). La composición de las soluciones empleadas en este protocolo se detalla en la Tabla 2.

3.4 Inmunofluorescencia

Las secciones de 5µm de grosor se desparafinaron mediante lavados con xileno y se rehidrataron mediante lavados sucesivos en etanol en concentración decreciente (100%, 90%, 70%, 50% y 30%). A continuación, los antígenos se desenmascararon por incubación de solución citrato pH=6 (10mM citrato sódico, 0.05% Tween20) en una olla a presión durante 3 minutos a presión intermedia. Las secciones se dejaron atemperar en la propia solución durante 20 minutos y se permeabilizaron durante 10min en 0.5% Triton-X100 en PBS. A continuación, las secciones se bloquearon con suero de cabra al 10% (16210-072, Life Technologies, NY, EEUU) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó el anticuerpo primario en suero de cabra al 10% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras varios lavados con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado (Life Technologies, NY, EEUU o Dako, Dinamarca) en albúmina sérica bovina (BSA) al 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. En los casos necesarios, la señal se amplificó usando tiramidas (TSA System, Perkin-Elmer, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante e incubando durante 3min. Finalmente, las secciones fueron incubadas con DAPI (FORMULA, Millipore, EEUU) para teñir los núcleos durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y montadas con medio de montaje específico de inmunofluorescencias (Fluorescent Mounting Medium, S3023, Dako, Dinamarca). Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal Zeiss LSM700 (Zeiss, Alemania) o Nikon A1R (Nikon, Japón).

Epítopo	Anticuerpo 1º		Anticuerpo 2º	
	Referencia	Dilución	Tipo	Dilución
BrdU	347580 (BD)	1:100	HRP	1:100
CD31	Ab28364 (Abcam)	1:100	HRP	Kit FLEX (K4003 Dako)
GLUT1	07-1401 (Millipore)	1:200	Conjugado	1:400
HIF1a	NB100-449 (Novus)	1:100	HRP	1:100
Ki67	Ab16667 (Abcam)	1:100	HRP	1:100
P70(pThr389)	9205 (Cell Signaling)	1:100	HRP	1:100
pH3	06-570 (Millipore)	1:100	HRP	1:100
Pimonidazol	PAb2627 (Hypoxyprobe)	1:100	HRP	1:100
SMA-Cy3	C6198 (Sigma)	1:300	N/A	N/A
TnTc	CT3 (DSHB)	1:200	Conjugado	1:400

Tabla 3 – Anticuerpos primarios empleados y condiciones de uso

Para cada epítopo analizado por inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (primera columna), la tabla detalla la referencia (segunda columna) y dilución del anticuerpo primario (tercera columna), así como el tipo de anticuerpo secundario utilizado (cuarta columna) y su dilución (quinta columna).

Para las tinciones de membrana, las secciones se incubaron con aglutinina de germen de trigo (WGA, del inglés *Wheat Germ Agglutinin*) conjugada con Cianina 5 (W32466, Life Technologies, EEUU) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las condiciones específicas para cada anticuerpo primario y la referencia de los mismos se encuentran recogidas en la Tabla 3.

3.5 Inmunohistoquímica

Para las tinciones de inmunohistoquímica se siguió un protocolo análogo al seguido para las tinciones de inmunofluorescencia. Sin embargo, en el caso de la inmunohistoquímica las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Dako, Dinamarca) y la señal se reveló mediante 3,3'-diaminobencidina (DAB), siguiendo las instrucciones del fabricante (K3468, Dako, Dinamarca).

4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1 Extracción de ARN de corazón embrionario

El ARN total fue extraído por lisis mediante QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, EEUU) y el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la homogeneización de las muestras embrionarias se empleó una jeringa de 1mL con una aguja de 25 gauges, durante 20 inyecciones o hasta la completa disociación del tejido. El ARN total embrionario fue eluido en un volumen total de 30µL.

4.2 Obtención de ADN codificante mediante reacción de retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción para la obtención de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo mediante el kit comercial MultiScribe™ Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez finalizada la reacción, el volumen resultante se llevó a un volumen final de 100µL, se midió la concentración del ADNc obtenido mediante un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EEUU) y se ajustó su concentración a 250ng/µL.

4.3 PCR cuantitativa

Todas las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se llevaron a cabo en un termociclador AB7000 (Applied Biosystems, EEUU). En todos los casos se empleó SYBR Green PCR Master Mix (4472908, Applied Biosystems, EEUU). Los oligonucleótidos específicos para cada transcrito fueron obtenidos de PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) (Spandidos y cols., 2009, 2008; Wang y Seed, 2003) y analizados para comprobar que flanqueaban la unión entre dos exones, o bien diseñados mediante la herramienta en línea Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/webif.php>). Las secuencias de los oligos empleados y los productos obtenidos se detallan en la Tabla 4. En cada reacción se emplearon 500ng de ADNc como molde.

Gen	Oligo directo	Tm	Oligo reverso	Tm	pb
<i>Acacb</i>	TCAAGTGTATGCGCTCCATC	59,8	TGGGACAGGGACGTACTGAT	60,4	146
<i>Acads</i>	TGGGATGGGCTTCAAATAG	59,9	CTCGGCATACTTCACAGCAC	59,5	115
<i>Acsf3</i>	AGGAGTGGAAGTACGCATCAT	60,7	AACCCTGGAGTCACCTTTGTC	61,6	102
<i>Acs13</i>	TGTCTTTCTCATGGATGCCGA	61,2	CAGCACGGATGTGTCTCCTT	61,9	102
<i>Acss1</i>	GACACCCAAGGGACTCGTTC	62,2	CCTGGCTGGTAGTCAAACACG	62,9	87
<i>Acta1</i>	CCCAAAGCTAACCGGGAGAAG	62,4	CCAGAATCCAACACGATGCC	61,1	134
<i>Aimp2</i>	ACTTGGACGTAACCAACATCC	60,0	TCAGCGCCCCATAGTCCTT	62,7	102
<i>Ak4</i>	CACACGCCTAATGATGTCAGAA	60,4	TGCCTGTACTAATGTCCTCGG	61,0	85
<i>Anf</i>	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	60,2	GGGGGCATGACCTCATCTT	61,1	126
<i>Ank2</i>	AGATTACTGTGCAGCATAACAGG	60,4	TGGTTGTAAAGGAAACACACTCA	60,0	106
<i>Ant1</i>	GTCTCTGTCCAGGGCATCAT	60,1	TCACACTCTGGGCAATCATC	59,6	127
<i>Atg9a</i>	CAGTTTGACACTGAATACCAGCG	61,6	AATGTGGTGCCAAGGTGATTT	60,4	114
<i>Atg9b</i>	TCACATCCAGAACCTGGACA	60,1	CCAGCAGGATACAGGCAAAG	60,8	80
<i>Beclin1</i>	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	62,9	TGGGCTGTGGTAAGTAATGGA	60,5	149
<i>Bnip3</i>	ACACAAGCGTTATGAAGAAAGGG	61,0	CTTCCAATGTAGATCCCCAAGC	60,4	115
<i>Cacna1d</i>	AGAGGACCATGCGAACGAG	61,4	CCTTCACCAGAAATAGGGAGTCT	60,8	63
<i>Col12a1</i>	TTGCAGCTAGTACCACTGAAAC	60,2	CCCTGGCTTTGTAGGACCAC	62,2	149
<i>Cox4i2</i>	CTGCCCGGAGTCTGGTAATG	62,0	CAGTCAACGTAGGGGGTCATC	61,9	109
<i>Cpt1b</i>	TCTTCTTCCGACAAACCTGA	60,7	GAGACGGACACAGATAGCCC	61,4	110
<i>Crat</i>	AGCAGGACTTTGTGGATCTACA	60,8	GCAGCGTCTCATTGTCAATCA	61,0	99

<i>Cx40</i>	AGGAAAGGAAGCAGAAGGCT	59,6	GACTGTGGAGTGCTTGTGGA	59,9	107
<i>CyclinD1</i>	TGACTGCCGAGAAGTTGTGC	62,7	CTCATCCGCTCTGGCATT	61,8	164
<i>CypD</i>	AACCCGCGAGTCTTCTTTGAC	62,6	TAATTCGGTGGAAAGGGCATC	60,1	187
<i>Dpp6</i>	GGGGAGTAATCCTCCACAGAG	60,7	GACAGACTGGTATCTTCCGCT	61,0	126
<i>Eci1</i>	ACCCAGCCCACTATGCTGA	62,7	GCTCCATTGATGGCAGACACTAA	62,5	97
<i>Epas1</i>	GTCACCAGAACTTGTGC	49,7	CAAAGATGCTGTTCATGG	53,2	249
<i>Fabp3</i>	ACCTGGAAGCTAGTGGACAG	60,6	TGATGGTAGTAGGCTTGGTCAT	60,3	106
<i>Glut1</i>	CTCTGTGCGCCTCTTTGTTAAT	60,0	CCAGTTTGAGAAGCCCATAAG	60,6	104
<i>Hif1a</i>	ACCTTCATCGGAACTCCAAAG	60,2	CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	60,5	228
<i>Hif1b</i>	GAGGGCTATTAAGCGACGGTC	62,3	CTGGTCATCATCGCATCTCAAA	60,4	85
<i>Hk2</i>	TGATCGCTGCTTATTCACGG	62,5	AACCGCTAGAAATCTCCAGA	60,3	112
<i>Kcne1</i>	ATGAGCCTGCCAATTCCAC	62,6	GAGCTGAGACTTACGAGCCA	61,0	108
<i>Kcne3</i>	GAGTGAATTCTTCTGCAAGC	59,1	TCAGTCCCGTTGGAAGTCTC	60,2	118
<i>Kcnk3</i>	CCTTCTACTTCGCCATCACC	59,7	GACTAGTGTGAGCGGGATGC	60,8	122
<i>Lamp2a</i>	ATGTGCCTCTCTCCGGTAAA	60,9	GCAAGTACCCTTTGAATCTGTCA	60,5	111
<i>Lars</i>	GAGCAGCAAGGGCAAATACTT	60,9	ACTGCAAACCTCACACTTGGATAA	60,1	102
<i>Lars2</i>	AGAGAGGAATTTGCACCCTGA	60,8	GCCTCCTTTTGATAGGCCAGTC	62,7	189
<i>Ldha</i>	ACATTGTCAAGTACAGTCCACAC	60,4	TTCCAATTACTCGGTTTTTGGGA	60,1	114
<i>Lpl</i>	GGGAGTTTGCTCCAGAGTTT	60,0	TGTGTCTTCAGGGGTCTTAG	60,5	115
<i>Mfn1</i>	ATGGCAGAAACGGTATCTCCA	60,9	CTCGGATGCTATTGATCAAGTT	60,2	153
<i>Mfn2</i>	CTGGGGACCGGATCTTCTTC	61,4	CTGCCTCTCGAAATTCTGAACT	60,5	143
<i>Mgarp</i>	GAAGGACGCATCTCTTCGCC	62,9	CGCCTTTGTTTGTCTTTCCGGT	62,1	187
<i>Mgp</i>	GGCAACCCTGTGCTACGAAT	62,5	CCTGGACTCTCTTTGGGCTTTA	61,8	134
<i>Mxi1</i>	AACATGGCTACGCCTCATCG	62,4	CGGTTCTTTTCCAACCTATTGTG	60,2	157
<i>Myo16</i>	GGGGCAGATCCACACACTC	62,0	TCCTCATCCTGATGGTTGACA	60,2	128
<i>Nix</i>	ACTGGGTATCAGACTGGTCCA	61,7	GCAGCACGTTTAGGGTGTC	61,0	79
<i>Nkx2.5</i>	ACCCTGACCCAGCCAAAG	61,0	GGCTTTGTCCAGCTCCACT	60,4	80
<i>Nmyc</i>	ACCCTGACCCAGCCAAAG	61,0	GGCTTTGTCCAGCTCCACT	60,4	80
<i>Naa10</i>	AGATGCGTATGCAATGAAGCG	59,7	AGATGCGTATGCAATGAAGCG	59,7	95
<i>Opa1</i>	TGGAAAATGGTTCGAGAGTCAG	60,0	CATTCCGTCTCTAGGTTAAAGCG	60,7	77
<i>Os9</i>	AATTGTTGAGCCCAATGAGAGAT	58,4	CTGTTTCGTGTCGCCAGTTGA	60,5	177
<i>p21</i>	CCTGGTGATGTCCGACCTG	61,7	CCATGAGCGCATCGCAATC	62,0	103
<i>p27</i>	ATGCTGTATTGGATAGACT	56,7	TTGATTGCTTGATGTGTAA	56,5	183
<i>p57</i>	AAGAGAACTGCGCAGGAGAA	60,2	TCTCTGGCCGTTAGCCTCTA	60,1	144
<i>p62</i>	GAAGTCTGCTATAAGTGCAGTGT	60,1	AGAGAAGCTATCAGAGAGGTGG	60,1	131
<i>Pcp4l1</i>	ATGAGCGAGCTTAACACCAAA	60,0	CTGCCAGGCTTCCCTTTTTC	61,2	77
<i>Pgc1a</i>	TCACACCAAACCCACAGAAA	59,9	GTGACTCTGGGGTCAGAGGA	60,2	137
<i>Pgk1</i>	TGGTGGGTGTGAATCTGCC	61,9	ACTTTAGCGCCTCCCAAGATA	60,7	124
<i>Phd3</i>	ATTGGGACGCCAAGTTACAC	59,9	TTCTGCCCTTCTTCAGCAT	60,0	197
<i>Prelid1</i>	CCCAGAATCAGACCATGACCA	61,2	AGTAAACACATCGTTCCTCCAC	60,0	81
<i>Prelid2</i>	ACATGGCTATCCGGAGTCAC	59,9	GTGATTGAAATTCGGCCTGT	59,9	130
<i>Scn4b</i>	TGGTCCTACAATAACAGCGAAAC	60,5	ACTCTCACCTTAGGGTCAGAC	60,0	83
<i>Scna5</i>	TGCTGAATAAGGGCAAACCA	60,2	GCTGAAGAGCGAATGTACCAAAA	61,3	119
<i>Slc16a3</i>	GACACGGCTTGGATCTCCTC	62,0	CATTCCAGGGACGCAAAGAG	63,0	132

<i>Slc3a2</i>	TGATGAATGCACCCTTGTACTTG	60,8	GCTCCCCAGTGAAAGTGGA	61,2	183
<i>Slc7a3</i>	TCTCCTACGTCATTGGTACAGC	61,2	AGAGTCCGAGAGATGTGGTTTC	61,2	88
<i>Stc1</i>	CTCCAAACTCAGCAGTGATTCT	60,5	GAGGCAGCGAACCATTCA	62,2	135
<i>Tnni2</i>	CGGAGGGTGCGTATGTCTG	62,1	CAGGTCCCGTTCCTTCTCA	60,6	129
<i>Tpi1</i>	CCAGGAAGTTCTTCGTTGGGG	62,6	CAAAGTCGATGTAAGCGGTGG	61,3	144
<i>Trp53</i>	CTCTCCCCCGCAAAGAAAAA	60,8	CGGAACATCTCGAAGCGTTTA	60,4	84
<i>Ucp3</i>	CCTACGACATCATCAAGGAGAAGT	62	TCCAAAGGCAGAGACAAAGTGA	62,2	83
<i>Usp20</i>	ACAAGAAGCGGCCAAGCTATG	61,2	CCATTAGGCAGCGTAGGAACT	59,9	120
<i>Vegfa</i>	ACAGAAGGAGAGCAGAAGT	61,8	TCAATCGGACGGCAGTAG	63,0	77
<i>Vhl</i>	TGTGCCATCCCTCAATGTCTG	62,2	GCACCGCTCTTTCAGGGTA	61,7	79
<i>Vhl^{del}</i>	TCAGCCCTACCCGATCTTACC	62,5	ATCCCTGAAGAGCCAAAGATGA	62,3	79
<i>Hif1^{adel}</i>	CACCGATTGCGCATGGA	62,7	TCGACGTTCAGAACTCATCTTTT	61,4	66
<i>Gusb</i>	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	59	CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC	59	73
<i>Hprt</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	60,8	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	62,4	142
<i>Rpl32</i>	CACCAGTCAGACCGATATGTGAAA	61,0	TGTTGTCAATGCCTCTGGGTTT	62,1	64

Tabla 4 – Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR cuantitativa

La tabla contiene, para cada gen analizado mediante PCR cuantitativa (primera columna), la secuencia y temperatura de melting (T_m) del oligo directo (segunda y tercera columna), la secuencia y temperatura de melting del oligo reverso (cuarta y quinta columna) y el tamaño del producto generado en la reacción (sexta columna)

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer paso a 50°C durante 2 minutos, un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de dos pasos: 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Finalmente, se llevó a cabo un paso de disociación para confirmar la especificidad de los oligos empleados. Cada gen para cada muestra fue analizado en triplicado en la misma carrera.

Una vez finalizada la reacción y la toma de medidas, se empleó el programa SDS (Applied Biosystems, CA, EEUU) en configuración automática para normalizar la línea base y marcar un umbral de amplificación específico de cada gen analizado. Los valores C_q obtenidos tras este análisis preliminar se analizaron mediante el programa qBase (Biogazelle, Bélgica), considerando la eficiencia específica de cada pareja de oligos y usando tres transcritos (*Gusb*, *Hprt* y *Rpl32*) como genes de referencia. Se descartaron aquellos valores dentro de los triplicados que diferían más de 0.5 unidades en sus C_q o aquellos genes con una diferencia menor de 5 unidades entre su C_q y el de su control negativo. La eficiencia de cada pareja de oligos se calculó llevando a cabo el mismo protocolo, con diluciones seriadas de ADN control para la misma pareja.

4.4 Síntesis de sondas de ARN para hibridación *in situ*

Las sondas de ARN para hibridación *in situ* marcadas con DIG se obtuvieron a partir de fragmentos específicos para el gen deseado, obtenidos por reacción de PCR a partir de ADN. Los oligos se diseñaron mediante la herramienta Primer3, considerando un tamaño de amplicón de entre 500 y 800 pb y una

temperatura de fusión (T_m) en torno a 58°C. A la secuencia de los oligos se añadió para su síntesis la secuencia del promotor de la polimerasa SP6 (ATTTAGGTGACACTATAGAA, en el extremo 5' del oligo directo) o la secuencia del promotor de la polimerasa T7 (GTAATACGACTCACTATAGGG, en el extremo 5' del oligo reverso). Las secuencias de los oligos empleados (sin las colas de secuencias promotoras) están detalladas en la Tabla 5. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µL. A 10µL de mezcla de reacción comercial (K1082, Thermo Scientific, MA, EEUU) se añadieron 1µL de cada oligo a una concentración de 10µM (Sigma-Aldrich, EEUU) y 250ng del ADNc obtenido anteriormente. El volumen final se ajustó con agua destilada. El programa empleado fue el siguiente: un paso inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos con tres etapas cada uno (94°C, 45 segundos, 58°C 45 segundos y 72°C 90 segundos) y un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Tras la reacción, los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (28704, Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Gen	Oligo directo	Oligo reverso	Sonda
<i>Bmp10</i>	TCAAGACGCTGAACTTGTCG	TGCTCCTTGTCATTGCTTTG	610
<i>Cx40</i>	CTCCTCCCCCTGACTTCAAT	GCTGGTGTGAACCTGTCCT	606
<i>Glut1</i>	GGACTTTGATGGCTCCAGAA	GAGTGTCCGTGTCTTCAGCA	567
<i>Hcn4</i>	GCATGATGCTTCTGCTGTGT	CCAGCTTTCGGCAGTTAAAG	501
<i>Hif1a</i>	GCAGCAGGAATTGGAACATT	GGACAACTCCCTCACCAAA	635
<i>Ldha</i>	GGAAGGAGGTTCAACAAGCAG	CTGCAGTTGGCAGTGTGTCT	543
<i>Pdk1</i>	CTGGGTTTGGTTACGGATTG	GCCAGCTACTCCACGTTCTT	652

Tabla 5 – Oligonucleótidos empleados en la síntesis de sondas para hibridación *in situ*
 La tabla contiene, para cada gen analizado mediante hibridación *in situ* (primera columna), las secuencias del oligo directo (segunda columna) y reverso (tercera columna), así como el tamaño de la sonda (cuarta columna)

La síntesis de las sondas de secuencia complementaria al ARNm (“anti-sense”) y marcadas con DIG se llevó a cabo mediante una reacción de transcripción *in vitro*. Para ello se empleó una mezcla de reacción de la polimerasa T7 (concentraciones finales: 0.01M DTT, 20U RNasin Plus RNase Inhibitor (N2611, Promega, EEUU), DIG RNA Labeling Mix 1X (11277073910, Roche, Suiza) y 20U polimerasa T7 (10881775001, Roche, Suiza)) a la que se le añadieron 100-200ng del fragmento purificado anteriormente. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 6 horas. Finalmente, las sondas se purificaron mediante el kit ilustra AutoSeq G50 Dye Terminator Removal (27-5340-01, GE Healthcare, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas purificadas se conservaron a -80°C.

En el caso de las sondas de las sondas de *Anf*, *Mycn*, *Nkx2.5* y *Tbx5*, fueron cedidas por los laboratorios del Dr. José Luis de la Pompa y del Dr. Miguel Manzanares. En todos los casos se linealizó el plásmido mediante digestión con la enzima de restricción correspondiente. El plásmido lineal se empleó como molde para la reacción de transcripción descrita.

5 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.1 Extracción de proteína de corazón embrionario

Los corazones embrionarios conservados a -80°C se homogeneizaron mediante una aguja de 25Ga en hielo en solución RIPA (1% NP40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH=8 y 50mM Tris-HCl pH=8 en agua destilada). En el momento de su uso se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa: mezcla de inhibidores de proteasas comercial (11697498001, Roche, Suiza), 20mM NaF, 0.1mM PMSF y 1 μ M ortovanadato sódico. Una vez obtenidos los lisados, se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C , se descartó el precipitado y se midió la concentración de proteína en el sobrenadante mediante el kit comercial Pierce BCA Protein Assay kit (23227, Thermo Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el momento de su uso, a 15 μ g de muestra se les añadieron 10 μ L de tampón de carga 5X (0.3M Tris-HCl pH=6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 0.05% azul de bromofenol) y el volumen de agua necesario para un volumen final de 50 μ L y se incubaron a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas.

5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevó a cabo mediante el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Handcast (BioRad, EEUU). Se emplearon geles separadores al 12% para S6K y pS6K. En todos los casos, el gel concentrador se preparó a una concentración de acrilamida del 5%. La composición de los geles se detalla en la Tabla 6. Se cargaron las muestras y 10 μ L de marcador de peso molecular (BlueStar Prestained Protein Marker, MWCP03, Nippon Genetics, Japón) en el gel y éste se corrió en tampón de electroforesis (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% SDS) a 120V hasta la salida del frente por la parte inferior del gel. A continuación, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF previamente activada en metanol. Se empleó un sistema de transferencia húmeda con tampón de transferencia en presencia de SDS (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) durante 90 minutos a 400mA.

Componente	Gel separador	Gel concentrado
Acrilamida-bisacrilamida 29:1	12%	5%
Tris 1.5M pH=8.8	0.37M	N/A
Tris 1M pH=6.8	N/A	0.125M
SDS	0.1%	0.1%
Persulfato amónico	0.1%	0.1%
TEMED	0.04%	0.1%

Tabla 6 – Composición de los geles de Western-Blot

La tabla detalla, para cada uno de los componentes (primera columna), las concentraciones finales en el gel separador (segunda columna) y en el gel concentrador (tercera columna).

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron con TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=7.6) con 0.05% Tween20 (TBS-T) y se bloquearon en reactivo de bloqueo para Western-Blot al 1% en TBS (11921673001, Roche, Suiza) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

Finalmente, las membranas se separaron en dos partes, una con la proteína de interés y otra con la tubulina para el control de carga, y se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos 1:1000 en reactivo de bloqueo para Western-Blot al 0.5% en TBS-T durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados se detallan en la Tabla 7.

Epítopo	Anticuerpo 1º	
	Referencia	Dilución
E4BP-1	236B4 (Cell Signaling)	1:1000
E4BP-1(pThr37/46)	53H11 (Cell Signaling)	1:1000
α-Tubulina	T9026 (Sigma-Aldrich)	1:2000

Tabla 7- Anticuerpos primarios empleados en el análisis por Western-Blot
Para cada epítopo (primera columna), se detalla el anticuerpo primario empleado (segunda columna) así como la dilución de uso (tercera columna).

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario de la especie correspondiente conjugado a peroxidasa (Dako, Dinamarca), diluidos 1:5000 de forma análoga al anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación.

Tras dos lavados de 20 minutos en TBS-T y un lavado adicional de 10 minutos en TBS, las membranas se incubaron durante 3 minutos en ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, UK) para el desarrollo de la señal de luminiscencia. La señal se detectó usando el sistema LAS-3000 Imaging System (Fujifilm, EEUU).

5.3 Detección de actividad COX4 sobre cortes frescos

Las criosecciones se dejaron atemperar 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se eliminó el OCT mediante un lavado de 10 minutos en PBS 1X. Seguidamente, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda en solución COX-IV (0.05M tampón fosfato, 0.22M sacarosa, 3.6mg/mL catalasa (C9322, Sigma Aldrich, EEUU), 1.6mg/mL citocromo C (DC506, Sigma Aldrich, EEUU), 1mg/mL DAB (D5905, Sigma Aldrich, EEUU)).

Para preparar el tampón fosfato al 0.05M se mezclaron 9.5mL de una solución de 0.2M NaH₂PO₄ con 40.5mL de una solución de 0.2M Na₂HPO₄, se ajustó el pH a 7.4 y se llevó a un volumen final de 200mL. Tras la incubación, las secciones se lavaron durante 5 minutos en PBS 1X y se post-fijaron en PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron en medio de montaje Aquatex (108562, Merk, EEUU).

6 SECUENCIACIÓN MASIVA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

6.1 Preparación de la muestra, creación de librerías y secuenciación

El ARN extraído a partir de ventrículos de embriones de E12.5 (ver puntos 2.1.3 y 4.1) se cuantificó y se analizó su pureza mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EEUU). La integridad del ARN se verificó mediante un analizador Agilent 210 Bioanalyzer (Thermo Scientific, EEUU). A continuación, se construyeron librerías marcadas e indexadas de ADNc a partir de 500ng de ARN total mediante el kit TruSeq RNA Sample Preparation vs2 (Illumina, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas librerías se cuantificaron mediante un ensayo Quant-iT ssDNA HS en un fluorímetro Q-bit (Life Technologies, EEUU). El tamaño medio de la librería y su distribución de tamaños se determinó mediante un ensayo DNA 1000 en un analizador Agilent 2100 Bioanalyzer.

Las librerías se normalizaron a una concentración de 10nM mediante 10mM Tris-HCl pH8.5 con 0.1% Tween20, sometidas a una celda de flujo Illumina para la generación de clusters mediante el kit True Seq SR Cluster Kit V2 cBot (Illumina, EEUU) y secuenciadas por síntesis. Se generaron lecturas únicas de 75 pb mediante el kit TruSeq SBS v5 (Illumina, EEUU) en una plataforma de análisis genómico Ix siguiendo un protocolo estándar de secuenciación de RNA. Las lecturas se procesaron posteriormente mediante el paquete CASAVA (Illumina, EEUU) para separarlas según los índices de los adaptadores y generar los archivos fastq.

6.2 Análisis bioinformático

6.2.1 Análisis de genes diferencialmente expresados

Primeramente se asignó la calidad a cada una de las lecturas por preprocesamiento mediante el software FastQC (Andrews, 2010). A continuación, las secuencias adaptadoras de Illumina se eliminaron mediante el programa Cutadapt v1.3 (Martin, 2011) y las lecturas menores de 30 pb fueron eliminadas. El conjunto de lecturas resultante se mapeó contra el transcriptoma de ratón correspondiente a la versión 70 de Ensembl (GRCm38) y se cuantificó mediante RSEM v1.2. (Li y Dewey, 2011). Los valores de expresión crudos así obtenidos se procesaron mediante el paquete de Bioconductor EdgeR (Robinson y cols., 2010) para su normalización, mediante el método TMM, y análisis de la expresión diferencial, mediante el uso de una variable de bloqueo para tener en cuenta los grupos correspondientes a cada camada. En el caso del análisis de la línea *Vhl/Nkx2.5*, dos muestras se clasificaron como outliers en base a gráficos de escalado multidimensional y fueron descartadas. Para el análisis de expresión, sólo se consideraron aquellos genes expresados a un nivel mínimo de 1 cuenta por millón en al menos dos muestras. Así mismo, se consideraron cambios significativos en la expresión de cada gen si el p-valor ajustado por el método Benjamini/Hochbers era menor a 0.05.

6.2.2 Análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes

Para el análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica, los genes diferencialmente expresados se analizaron mediante GOrilla (Eden y cols., 2009) para identificar aquellos términos enriquecidos pertenecientes a la ontología de Procesos Biológicos. Los términos enriquecidos se filtraron aplicando un umbral al p-valor de 0.001 y se agruparon de forma manual en categorías definidas *ad hoc*. La asociación entre genes y términos enriquecidos se representó gráficamente mediante GOplot (Walter y cols., 2015).

7 OTRAS TÉCNICAS

7.1 Espectroscopia por resonancia magnética nuclear

Los corazones embrionarios extraídos se examinaron mediante Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Ángulo Mágico a alta resolución (HR-MAS, del inglés, *High Resolution Magic-Angle Spinning*). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C para reducir la degradación de los metabolitos del tejido. La espectroscopia se llevó a cabo a 500.13MHz mediante un espectrómetro Bruker AVIII 500 (Bruker, EEUU) a 11.7T. Las muestras se colocaron en un rotor de óxido de circonio de 50µL mediante un inserto cilíndrico, en presencia de 50µL de una solución 0.1mM de ácido trimetilsililpropanoico (TSP) en agua deuterada. Las muestras se hicieron girar a 5000Hz para eliminar los efectos de las bandas de spinning laterales del espectro adquirido. El espectro estándar, una vez suprimido el espectro del disolvente, se agrupó en 32000 puntos, promediados tras 3000 adquisiciones.

Las adquisiciones de 4 horas emplearon una secuencia de pulsos CPMG con un TE=10ms y un ancho espectral de 6009.61Hz (antes de la aplicación de la transformada de Fourier). Las señales del decaimiento de inducción libre (FID, del inglés *Free Induction Decay*) se multiplicaron por una función de peso exponencial correspondiente al ensanchamiento de la línea de 0.3Hz. Los espectros se referenciaron al singlete del TSP a 0ppm de desplazamiento químico.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el paquete de R Metabonomic (Izquierdo-García y cols., 2009). La región de desplazamiento comprendida entre 4.90 y 5.20ppm se excluyó del análisis para eliminar los efectos aleatorios de variación en la supresión de la resonancia del agua, así como la región entre 0 y 0.04ppm, por contener la referencia interna del TSP. A continuación, los espectros se alinearon a la señal del TSP, se ajustó la fase y la línea base y se normalizaron a la suma total de las regiones espectrales. Finalmente, para la cuantificación metabolómica, las señales se integraron individualmente usando el algoritmo Global Spectral Deconvolution del software MestRenova v.10 (Mestrelab Research SL, Spain).

7.2 Ecocardiografía

Los ratones adultos, con el tórax previamente depilado, fueron anestesiados por anestesia inhalatoria al 1.5% de isoflurano a una velocidad de flujo de 1L/min. Una vez alcanzado el plano anestésico, se adquirieron las imágenes mediante una sonda MS400, a 30MHz para las imágenes 2D y en modo M y a 24MHz para los modos color y Doppler pulsado.

En el caso de hembras gestantes, fueron anestesiadas por anestesia inhalatoria al 2% de isoflurano a una velocidad de flujo de 1L/min. Una vez alcanzado el plano anestésico, se practicó una incisión en el abdomen de unos 3cm de longitud y se expuso el útero sin dañar los vasos sanguíneos que conectan cada decidua a la circulación materna. Las imágenes se adquirieron con una sonda MS700, a 50MHz para los modos 2D y M y a 40MHz para los modos color y Doppler pulsado. Tras la adquisición de todos los embriones, la hembra gestante fue sacrificada por dislocación cervical sin detener la anestesia y el útero fue extraído.

En todos los casos se empleó un escáner de ultrasonidos VEVO-2100 (Visualsonics, Canada). Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa VEVO-2100.

7.3 Tratamientos de hipoxia in vivo

Se introdujeron hembras C57BL/6 gestantes a día E10.5 o E12.5 en una cámara de hipoxia (Coy, MI, EEUU) durante 48 horas al 10% O₂. Transcurrido ese tiempo, las hembras fueron sacrificadas y los embriones extraídos como se describe previamente.

7.4 Microdissección por captura por láser

Las criosecciones frescas de corazones de embriones a E12.5 a 8µm de grosor se recogieron sobre portaobjetos especiales recubiertos de una membrana PEN (polietilénnaftalato) de 2µm. A continuación, se lavaron durante 5 segundos en baños sucesivos de xileno (x2), etanol 100%, etanol 90%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 30% y agua destilada (x2). A continuación, se tiñeron durante 20 segundos con hematoxilina y se deshidrataron mediante lavados de 5 segundos siguiendo el proceso inverso al inicial. Para la selección del MC o de las trabéculas y la posterior captura del tejido se empleó un sistema de Microcaptura por Láser (AS-LMD, Leica, Alemania).

El material de cada portaobjetos con 24 cortes se capturó sobre 25µL de tampón de lisis del kit comercial de extracción de ARN empleado (RNeasy Mini Kit, 74104, Qiagen, EEUU). Cada uno de los triplicados estaba formado por el material proveniente de 2 corazones diferentes, cada uno capturado en 48 secciones.

8 ANÁLISIS DE IMAGEN

8.1. Cuantificación de parámetros morfológicos de corazones embrionarios

A partir de las imágenes de las tinciones de Hematoxilina-Eosina digitalizadas se midieron distintos parámetros morfológicos mediante el software NDP View (Hamamatsu, Japón). Por cada embrión, se cuantificó una sección en una vista transversal de 4 cámaras a la altura de las válvulas. En cada sección se cuantificó la distancia dorsal-frontal y la distancia septo-epicardio en cada cámara ventricular y la media de 3 medidas del ancho del septo y del grosor del miocardio compacto en cada ventrículo en la zona de máxima curvatura.

8.2 Cuantificación del área trabecular

Se empleó el software NDP View para exportar imágenes de la sección completa. Mediante el software ImageJ, se eliminó manualmente la sangre y las imágenes RGB se separaron en los tres canales. A continuación, se aplicó un umbral empírico al canal verde hasta abarcar toda el área de tejido. En la máscara resultante se seleccionaron manualmente las trabéculas y se midió su área. Para el análisis se emplearon las mismas secciones cuantificadas para los parámetros morfológicos.

8.3 Cuantificación de estructuras discretas y relativización

En todos los casos se empleó el plugin de ImageJ CellCounter para la cuantificación manual de estructuras discretas (núcleos positivos, estructuras endoteliales, células apoptóticas, etcétera).

8.3.1 Cuantificación de secciones teñidas mediante inmunofluorescencia

8.3.1.A Cuantificación del área de cardiomiocitos mediante tinción con aglutinina

El área de los cardiomiocitos se midió de forma manual mediante ImageJ, realizando selecciones siguiendo el contorno de la célula marcado con aglutinina. Se tomaron dos imágenes del VI, dos del VD y dos del SIV y en cada una de ellas se midió el área de 25 cardiomiocitos. Los cardiomiocitos medidos siempre estaban posicionados en orientación transversal a una altura que permitiese distinguir su núcleo. Se calculó el valor de área para cada región y cada embrión como el valor medio de los 50 valores medidos en cada región.

8.3.1.B Cuantificación de la proporción de núcleos positivos

Los núcleos positivos para el marcador de interés se cuantificaron de forma manual mediante el plugin CellCounter. Para el cálculo del número total de núcleos se adaptó un método descrito anteriormente (Tenbaum y cols., 2012). En concreto, se midió el valor de la intensidad integrada en 20 núcleos aleatorios, repartidos por toda la región a cuantificar, así como la intensidad integrada de todo el canal

correspondiente al DAPI. Se calculó la intensidad integrada media por núcleo como la media de los 20 valores de núcleos individuales. El número total de núcleos se obtuvo como el cociente entre la intensidad integrada total del canal DAPI y la intensidad integrada media por núcleo. Finalmente, la proporción de núcleos positivos, expresada como porcentaje, se calculó como el cociente entre el total de núcleos positivos y el total de núcleos.

En los casos necesarios, se llevó a cabo una distinción entre miocardio compacto y trabeculado. Para ello, como procesamiento previo de la imagen se definió manualmente una línea de separación entre la zona compacta y la trabecular. Esto permitió crear dos regiones de interés, una para cada zona. La cuantificación se realizó por separado en cada una de las regiones de forma análoga a como se ha descrito. Para el cálculo del valor global, se sumaron los valores obtenidos de núcleos positivos y núcleos totales en cada región.

8.3.2 Cuantificación de secciones teñidas mediante inmunohistoquímica

Las estructuras discretas se cuantificaron de forma manual mediante el plugin CellCounter. A continuación, el valor obtenido se relativizó al área de tejido. Para ello, la imagen RGB se separó en los tres canales. A continuación, se aplicó un umbral empírico al canal verde hasta abarcar toda el área de tejido. Finalmente, se midió el área limitada al umbral en la máscara resultante.

8.3.3 Cuantificación de imágenes de microscopía electrónica

Las imágenes se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión JEM1010 (Jeol, Japón) y una cámara digital acoplada (SC200, Gatan, EEUU). Para la cuantificación del número de mitocondrias y del número de gotas lipídicas, se adquirieron 10 imágenes del miocardio compacto y 10 imágenes de las trabéculas a una magnificación de 5000x. Ambas estructuras se cuantificaron mediante el plugin CellCounter.

Para la normalización por área, se eliminaron las zonas extracelulares de las mismas, se aplicó un umbral abarcando todo el tejido restante y se midió el área limitada al umbral de la máscara generada.

8.4 Cuantificación de intensidad de bandas de Western-Blot

La intensidad de las bandas se cuantificó usando ImageJ (Rasband, 2015), empleando la tubulina como control de carga. En el caso de los estudios de fosforilación, la forma total y la forma fosforilada de la proteína se normalizaron de forma independiente con la tubulina de su propia membrana. El grado de fosforilación se calculó finalmente como el cociente de los valores normalizados de la proteína fosforilada entre la proteína total.

9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA

En el caso de las cuantificaciones histológicas y de las imágenes de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica, así como las ecocardiografías embrionarias se agruparon los valores de embriones del mismo genotipo de camadas independientes. La significación estadística se calculó mediante un test t de Student de muestras no pareadas, considerando o no homogeneidad de varianzas en función del resultado del test de Levene.

En el caso de las ecocardiografías de ratones adultos, se realizó un Análisis de la Covarianza, empleando el peso del animal como covariable. Para obtener la significación final se empleó un test *post hoc* de Bonferroni.

Los datos procedentes del análisis metabolómico por resonancia magnética nuclear se agruparon por genotipo y se analizaron mediante un test t de Student de muestras no apareadas, asumiendo no homogeneidad de varianzas.

Para el análisis de los valores de expresión génica mediante PCR cuantitativa, se calculó la inducción para cada gen del embrión mutante respecto al embrión control para cada pareja analizada. Los ratios así obtenidos se analizaron mediante un test t de una muestra, considerando 1 (no inducción) el valor de referencia.

En el caso de los análisis de recuperación de mutantes a diferentes estadios, el valor obtenido en cada camada se comparó con el valor teórico esperado mediante el test de la suma de rangos de Wilcoxon mediante el software R (R Core Team, 2013).

Todos los test estadísticos, excepto en el caso del análisis de recuperación de mutantes, se realizaron mediante el programa SPSS16 (IBM, NY, EEUU). En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p\text{-valor} < 0.05$. Los valores se representaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (SEM, error estándar de la media, del inglés *Standard Error of the Mean*) usando GraphPad Prism5 (GraphPad, CA, EEUU).

RESULTADOS

1 DISTRIBUCIÓN DE HIF1 α EN EL CORAZÓN EMBRIONARIO

Como punto de partida para estudiar el papel de HIF1 en el corazón en desarrollo se determinó la distribución espacial de la subunidad HIF1 α dentro del tejido a lo largo de distintas etapas de la gestación. Para ello, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia contra HIF1 α , en combinación con el marcador específico de cardiomiocitos Troponina T cardíaca (TnTc).

Los resultados revelaron que a E9.5 HIF1 α marcaba intensamente los núcleos de cardiomiocitos, tanto del tracto de salida como del miocardio ventricular y auricular, sin señal para HIF1 α en el endocardio (Fig. 7). Sin embargo, a E10.5, estadio al cual se empiezan a definir las trabéculas primitivas, la señal de HIF1 α se mantuvo elevada en los cardiomiocitos del miocardio compacto (MC), mientras que las trabéculas presentaron una señal ligeramente reducida. Además, tanto el endocardio como el epicardio resultaron negativos para HIF1 α (Fig. 7).

A E12.5 se observó una clara restricción de la expresión de HIF1 α al MC y al septo inter-ventricular (SIV), siendo las trabéculas negativas, con señal prácticamente indetectable. El mismo patrón se observó a E14.5. (Fig. 7), aunque los niveles de proteína a este estadio se encontraron drásticamente reducidos en comparación con los presentes a E12.5, detectándose únicamente agrupaciones de pocos cardiomiocitos positivos en zonas aisladas del MC y del SIV (Fig. 7).

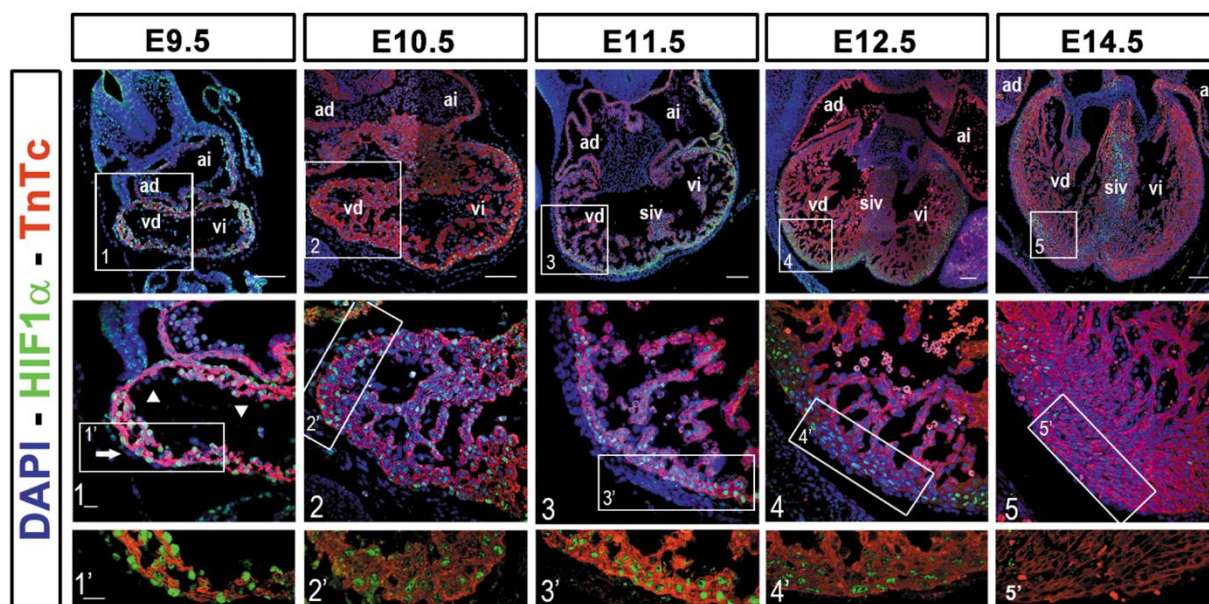


Figura 7 – Distribución de HIF1 α en el corazón embrionario

Inmunofluorescencia contra HIF1 α en secciones de corazón embrionario desde E9.5 a E14.5. Los núcleos se muestran en azul, HIF1 α en verde y la Troponina T en rojo. Las barras de escala indican 100 μ m (paneles superiores) y 20 μ m (paneles intermedios e inferiores). Los recuadros (1-5) muestran ampliaciones del ventrículo derecho. Los rectángulos (1'-5') muestran ampliaciones del miocardio compacto en esa región. La flecha blanca en 1 señala el epicardio. Las puntas de flecha blancas en 1 señalan el endocardio. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Según estas observaciones, podemos concluir que la distribución de HIF1α está regulada a nivel espacial y temporal en las etapas del desarrollo cardíaco comprendidas entre E9.5 y E14.5: HIF1α se restringe principalmente al MC, con niveles decrecientes a medida que progresa la gestación.

1.1 Compartimentos metabólicos en el corazón embrionario

A la vista de la distribución heterogénea de HIF1α entre MC y trabéculas, y su papel propuesto sobre la regulación del metabolismo embrionario del corazón (Neary y cols., 2014), nos planteamos que este factor podría establecer diferencias metabólicas entre las distintas zonas del corazón en desarrollo. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar, se determinó mediante inmunofluorescencia la distribución de la diana de HIF1α GLUT1, el principal transportador de glucosa expresado en cardiomiocitos embrionarios y codificado por el gen *Slc2a1*. Se observó que el miocardio a E9.5 presentaba niveles elevados de GLUT1, que no se detectó en el endocardio (Fig. 8A). Por otro lado, el análisis a E10.5 y E12.5 mostró que GLUT1 se expresaba principalmente en el MC, en las aurículas y en el SIV, sin expresión en las trabéculas, siguiendo un patrón análogo al observado para HIF1α. (Fig. 8A). Además, del mismo modo que HIF1α, los niveles de GLUT1 disminuyen drásticamente de E12.5 a E14.5, estadio al cual su expresión se restringe a pequeñas áreas en el SIV (Fig. 8A).

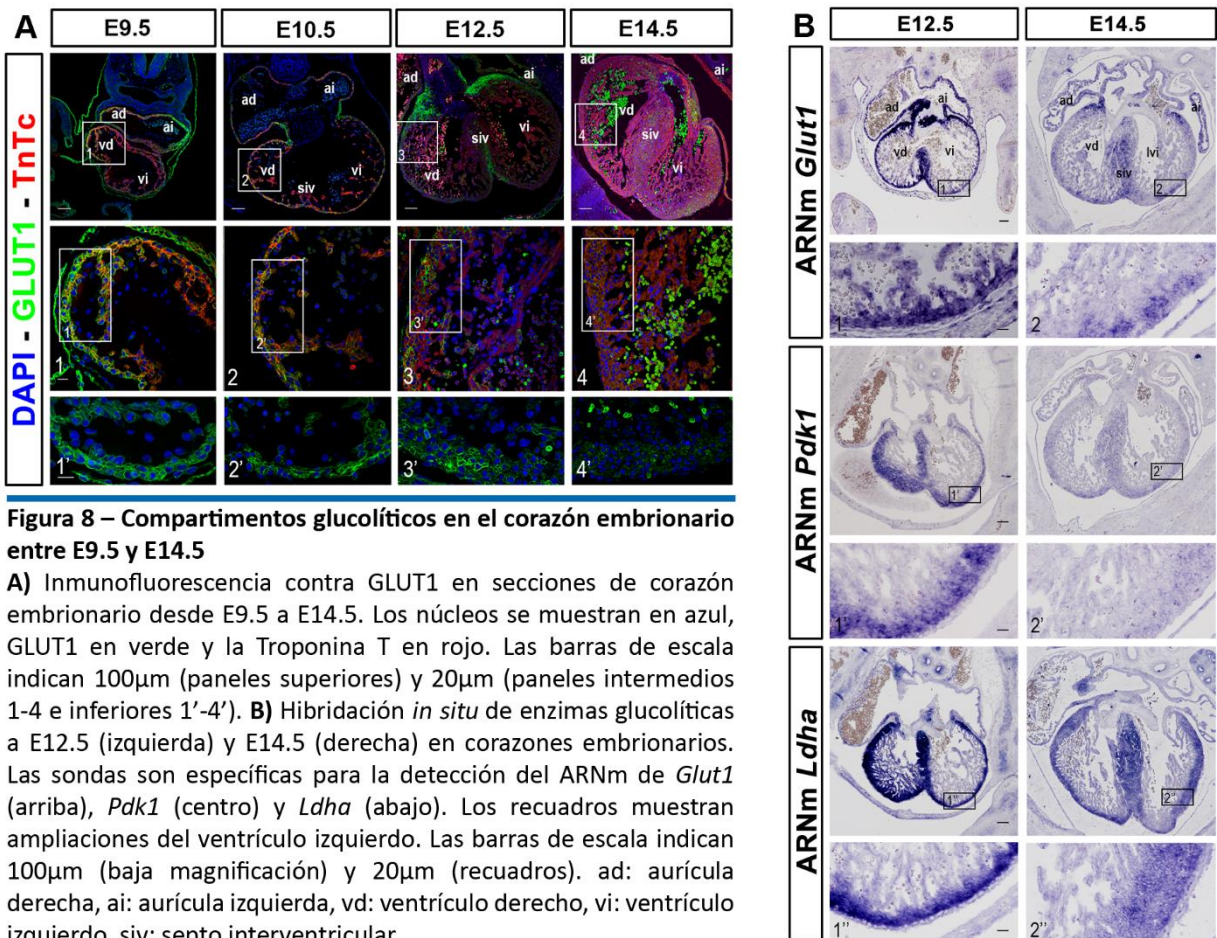
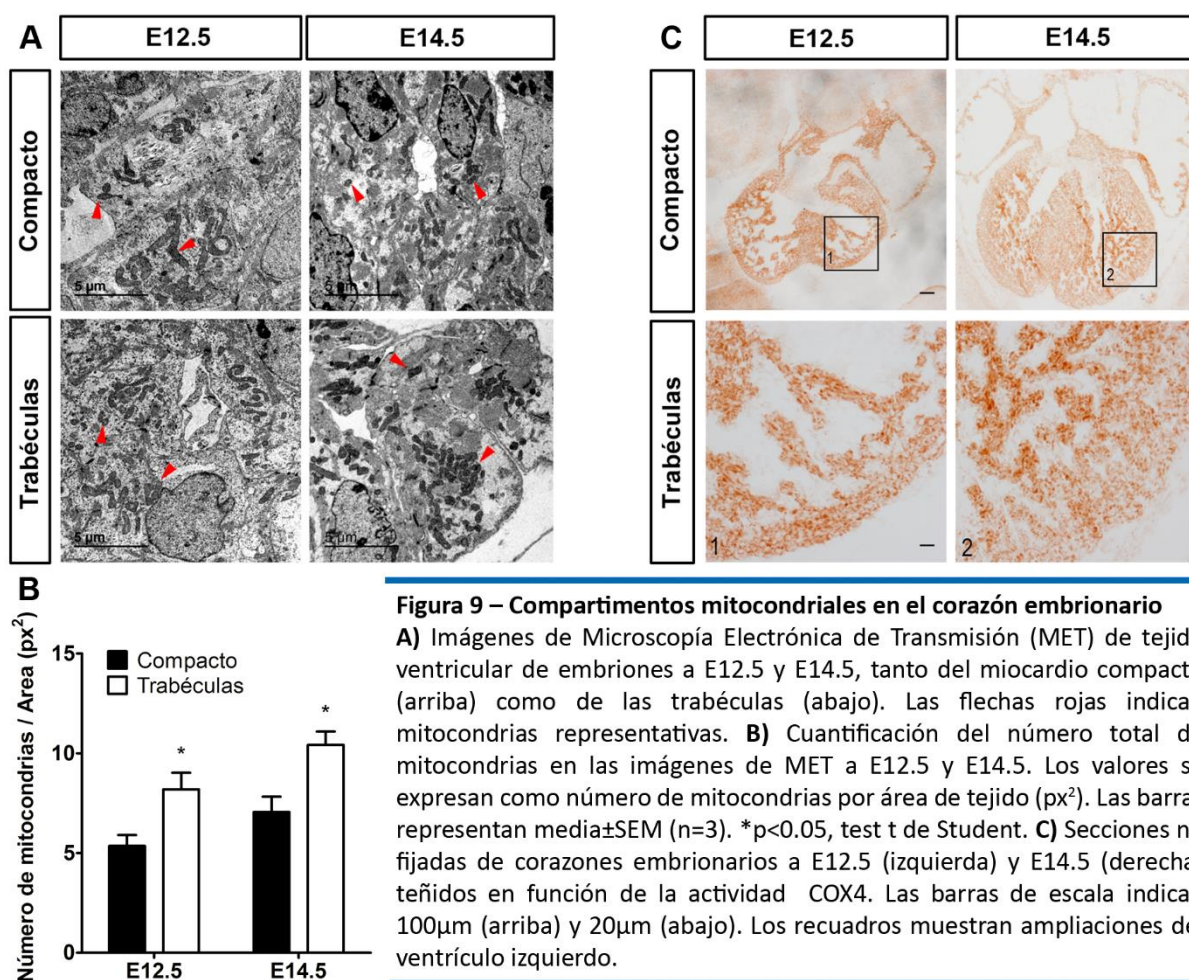


Figura 8 – Compartimentos glucolíticos en el corazón embrionario entre E9.5 y E14.5

A) Inmunofluorescencia contra GLUT1 en secciones de corazón embrionario desde E9.5 a E14.5. Los núcleos se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo. Las barras de escala indican 100μm (paneles superiores) y 20μm (paneles intermedios 1-4 e inferiores 1'-4'). **B)** Hibridación *in situ* de enzimas glucolíticas a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha) en corazones embrionarios. Las sondas son específicas para la detección del ARNm de *Glut1* (arriba), *Pdk1* (centro) y *Ldha* (abajo). Los recuadros muestran ampliaciones del ventrículo izquierdo. Las barras de escala indican 100μm (baja magnificación) y 20μm (recuadros). ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Para evaluar más a fondo el posible papel de HIF1 α en la regulación del programa glucolítico en el corazón embrionario, se analizó el patrón de expresión por hibridación *in situ* de los genes que codifican GLUT1 y las enzimas glucolíticas piruvato deshidrogenasa quinasa, codificada por el gen *Pdk1*, y lactato deshidrogenasa, codificada por el gen *Ldha*. Tanto a E12.5 como a E14.5 se detectó una expresión elevada de estos genes en el MC, pero no en las trabéculas, así como una marcada disminución en su expresión a E14.5 (Fig. 8B). La expresión preferencial en el MC de estos marcadores sugiere, por tanto, la activación de un programa génico coordinado basado en el establecimiento del metabolismo glucolítico en el MC en comparación con las trabéculas.

Debido a que HIF1 α puede, además de potenciar el metabolismo glucolítico, reprimir la actividad y el contenido mitocondrial (Zhang y cols., 2008), se analizó la distribución de mitocondrias en el MC y en las trabéculas tanto a E12.5 como a E14.5 mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Los resultados mostraron que, en ambos estadios, las trabéculas presentaban mayor número de mitocondrias que el MC (Figs. 9A). La cuantificación del número de mitocondrias por área de tejido mostró una tendencia al alza entre E12.5 y E14.5 (6.80 ± 0.71 vs 9.86 ± 0.65), así como un enriquecimiento significativo en las trabéculas respecto del MC a ambos estadios (1.32 a E12.5 y 1.27 a E14.5, Fig. 9B).



Con el fin de determinar si el aumento del contenido mitocondrial en las trabéculas respecto al MC se traducía en un incremento en la actividad mitocondrial, se realizó una tinción de actividad del complejo IV mitocondrial, basada en la deposición de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en función de la actividad de la citocromo c oxidasa 4 (COX4). A E12.5 se observó que la actividad COX4 era ligeramente superior en las trabéculas respecto del MC (Fig. 9C, paneles de la izquierda). A E14.5 la actividad COX4 se incrementó ligeramente y la diferencia entre ambas capas se hizo más marcada (Fig. 9C, paneles de la derecha). Estos resultados muestran que tanto el número como la actividad mitocondrial también se encuentran regionalizados en el corazón embrionario, en la dirección opuesta a los compartimentos glucolíticos. Además, sugieren que HIF1 α está implicado en el establecimiento de territorios metabólicos diferenciados en el miocardio embrionario.

2 DELECIÓN DE *Vhl* EN PROGENITORES CARDIACOS NKX2.5

Con el fin de determinar el papel directo de la distribución heterogénea de HIF1 α en la regulación del metabolismo embrionario y comprender su función en estas etapas del desarrollo, se diseñó una estrategia para hiperactivar la ruta de HIF en todo el miocardio embrionario mediante la generación de un modelo genético de ganancia de función de la ruta de hipoxia. Este modelo consistió en la delección específica del gen *Vhl*, que codifica el principal regulador negativo de HIF1 α (VHL), en progenitores cardiacos del linaje NKX2.5. Para ello, se empleó el alelo descrito de *Vhl* con el exón 1 flanqueado por sitios LoxP (Haase y cols., 2001) en combinación con una Cre recombinasa cuya expresión está controlada por el promotor del gen *Nkx2.5* (Stanley y cols., 2002).

Este modelo, *Vhl*^{f/f}/*Nkx2.5*^{Cre/+}, referido de aquí en adelante como el modelo *Vhl*/*Nkx2.5*, presentó recombinación efectiva del gen *Vhl* en tejido cardiaco embrionario a E12.5 sólo en presencia de la Cre recombinasa (Fig. 10A, carril 1 vs carril 3), sin observarse recombinación ectópica en otras regiones del embrión, como la cola, no pertenecientes al linaje NKX2.5, ni en ausencia ni en presencia de la Cre recombinasa (Fig. 10A, carril 2 y carril 4). Por otro lado, el análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión tanto de *Vhl* como de genes diana de HIF1 α (*Glut1* y *Phd3*) mostró un descenso significativo en la expresión de *Vhl*, paralelo a un incremento significativo para los genes diana (Fig. 10B) en el mutante *Vhl*/*Nkx2.5* respecto a su control. Estos resultados muestran, por tanto, una delección eficaz y específica de *Vhl* en el linaje NKX2.5.

Para determinar si la delección de *Vhl* se traducía en un incremento de los niveles de la proteína de HIF1 α se realizaron tinciones de inmunofluorescencia tanto a E12.5 como a E14.5. Por un lado, los niveles de HIF1 α en cardiomiocitos se mantuvieron elevados a E14.5 en el mutante *Vhl*/*Nkx2.5* (Fig. 10C), sin el descenso dramático en los niveles de HIF1 α observado en el control.

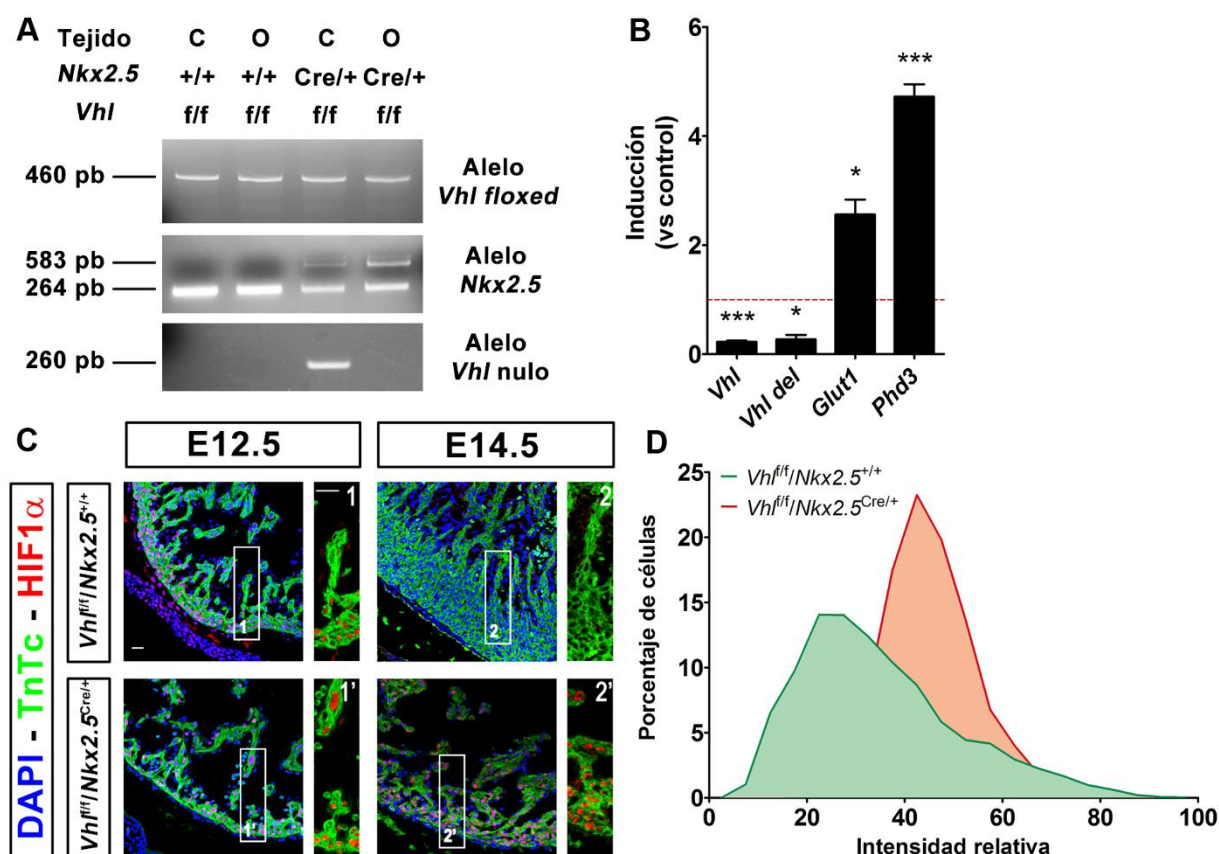


Figura 10 – Deleción de *Vhl* en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos

A) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de PCR obtenidos para *Vhl* y *Nkx2.5* sobre ADN genómico de corazón (C) y cola (O) en embriones control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*, carriles 1 y 2) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*, carriles 3 y 4) a E12.5. Gel superior: Bandas correspondientes a los alelos control (287pb) y floxed (460pb) del gen *Vhl*. Gel intermedio: Bandas correspondientes a los alelos control (264pb) y Cre (583pb) del gen *Nkx2.5*. Gel inferior: Alelo del gen *Vhl* procesado tras la recombinación mediada por la Cre (260pb). **B)** Cuantificación por PCR cuantitativa de los transcritos de *Vhl*, incluyendo la región floxeada (*Vhl* del), *Glut1* y *Phd3* en ventrículos deficientes en *Vhl* a E14.5. Las barras representan la inducción relativa a la expresión basal (línea roja) en los controles hermanos de camada (media±SEM, n=3). *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student. **C)** Inmunofluorescencia de HIF1α en embriones control (arriba) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (abajo) a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, la troponina T en verde y HIF1α en rojo. La barra de escala representa 20μm. Los rectángulos muestran ampliaciones de la pared del ventrículo derecho. **D)** Análisis representativo de la intensidad de fluorescencia correspondiente al canal de HIF1α a E12.5 en embriones control (curva verde) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (curva roja).

Por otro lado, tanto a E12.5 como a E14.5 se observó una expansión de la expresión de HIF1α a las trabéculas en los corazones mutantes, perdiéndose por tanto las regiones observadas en el embrión control (Fig. 10C). Además, la cuantificación de la intensidad relativa de fluorescencia de HIF1α en secciones tanto del mutante *Vhl/Nkx2.5* como del control mostró un desplazamiento de la curva de intensidades hacia la derecha, con mayor porcentaje de células con intensidades de fluorescencia elevada en los mutantes (Fig. 10D).

2.1 Caracterización fenotípica de los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Para evaluar posibles alteraciones asociadas a la pérdida de la regionalización de HIF1α tras la deleción de *Vhl*, se realizó un análisis histológico de los corazones embrionarios tanto a E12.5 como a E14.5. A

E12.5 (Fig. 11A) se observó un ligero adelgazamiento del MC de ambos ventrículos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* respecto a los controles, así como una tendencia a disminuir el grosor del SIV (Fig. 11B). Por otro lado, la esfericidad de los ventrículos, definida como la distancia del septo al epicardio dividida entre la distancia de la base de los ventrículos al ápex, fue mayor en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* que en los correspondientes controles (Fig. 11C). Sin embargo, no se detectaron alteraciones en el área total de tejido cardiaco ocupado por las trabéculas (Fig. 11D). Este fenotipo de adelgazamiento del MC y de dilatación ventricular sin afectación en las trabéculas observado a E12.5 se manifiesta de forma mucho más severa a E14.5 (Fig. 12A). A E14.5 los mutantes *Vhl/Nkx2.5* mostraron un mayor adelgazamiento del MC y del SIV (Fig. 12B), con mayor esfericidad de las cámaras ventriculares (Fig. 12C) y sin afectación en las trabéculas (Fig. 12D). También se observaron defectos del SIV, con crecimiento incompleto del mismo (Fig. 12A).

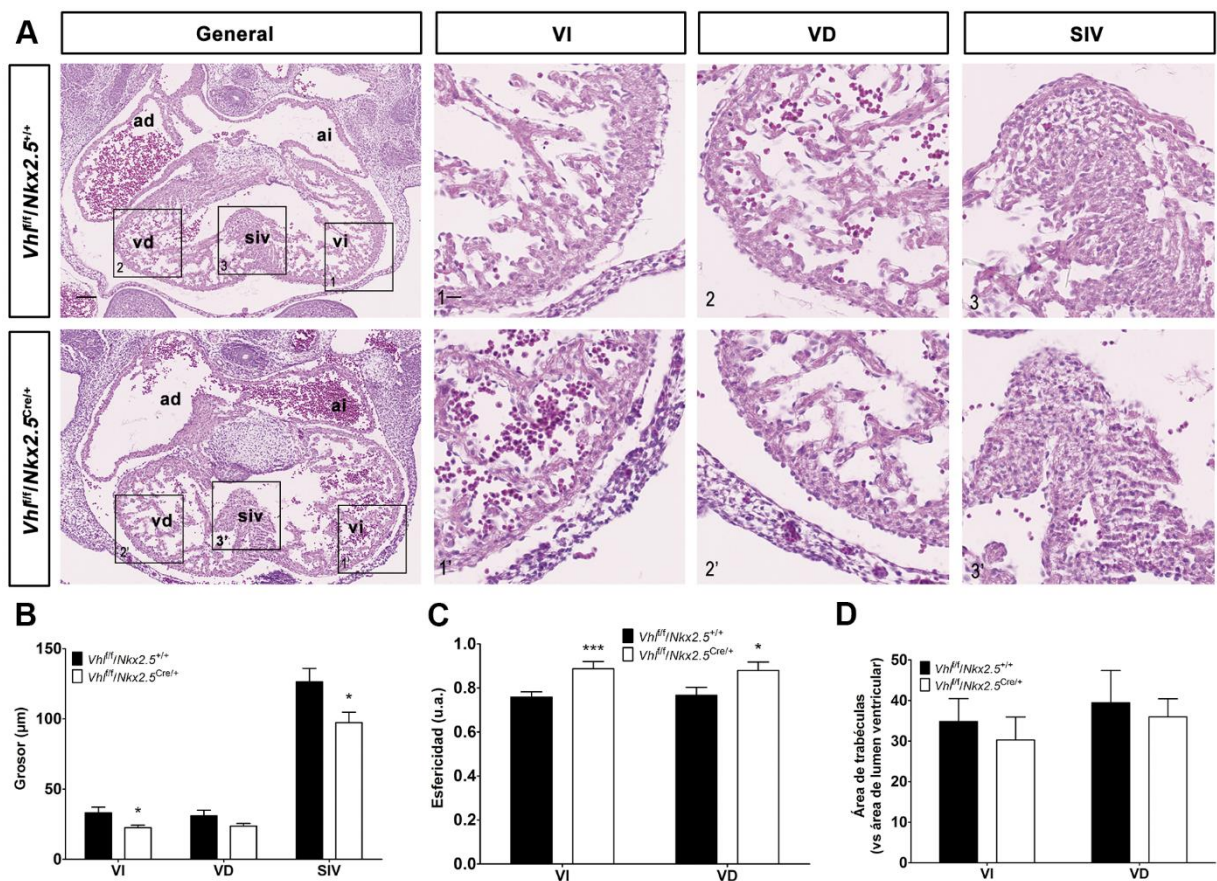
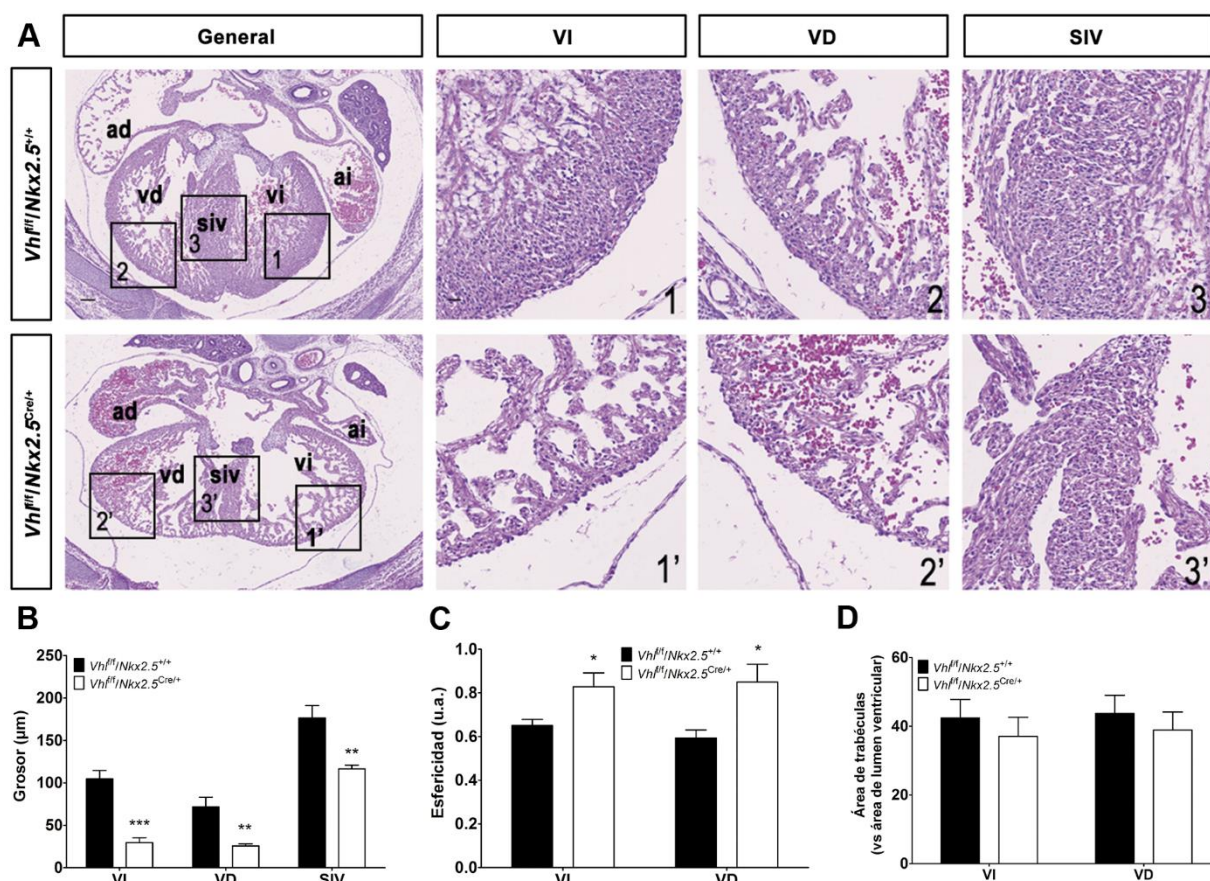


Figura 11 – Análisis histológico de los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E12.5

A) Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, arriba) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, abajo) a E12.5. Las barras de escala representan 100 μ m (general) y 20 μ m (recuadros). **B,C,D)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (B), de la esfericidad de los ventrículos (C) y del área de trabéculas, representada como porcentaje del área del lumen ventricular (D) en embriones control (barras negras) y mutantes (barras blancas). Las barras representan media \pm SEM (n=13 en B y C, n=5 en D) *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.



Además, la pérdida de *Vhl* provocó una alta letalidad embrionaria, significativa entre E15.5 y E17.5, sin ningún mutante recuperado en el momento del destete (Tabla 8).

Estadio	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	Total	Camadas	% Real	% Esperado	p-valor
E12.5	24	100	12	26.20±4.9	25	0.8135
E14.5	34	112	17	31.15±4.1	25	0.2208
E15.5-E17.5	11	83	11	11.18±5.2	25	0.0395
Destete	0	189	48	0.00±0.0	25	7.456x10 ⁻¹⁰

Tabla 8 – Análisis de recuperación de mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Para cada estadio, la tabla muestra el número de embriones mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) recuperados, el total de embriones/crías recuperados y el número de camadas analizadas. El porcentaje de mutantes recuperados, mostrado como media±SEM, y el porcentaje de recuperación esperado (25%) se compararon mediante el test de rangos de Wilcoxon.

Como alternativa a la delección de *Vhl*, se indujo HIF1α globalmente mediante exposición a hipoxia. En concreto, hembras gestantes a E10.5 o E12.5 se mantuvieron durante 48 horas en una cámara de

hipoxia al 10% de O₂. El análisis histológico de los embriones recuperados a E12.5 (Fig. 13A) o E14.5 (Fig. 13B), respectivamente, mostró el mismo adelgazamiento del MC observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*. La cuantificación del grosor, tanto de las paredes ventriculares del MC como del SIV, mostró un adelgazamiento de todas las regiones a ambos estadios (Fig. 13C), sugiriendo que el aumento de los niveles de HIF1 α podría estar asociado con el adelgazamiento del miocardio observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Sin embargo, este tratamiento no afectó a la esfericidad de los ventrículos (Fig. 13D).

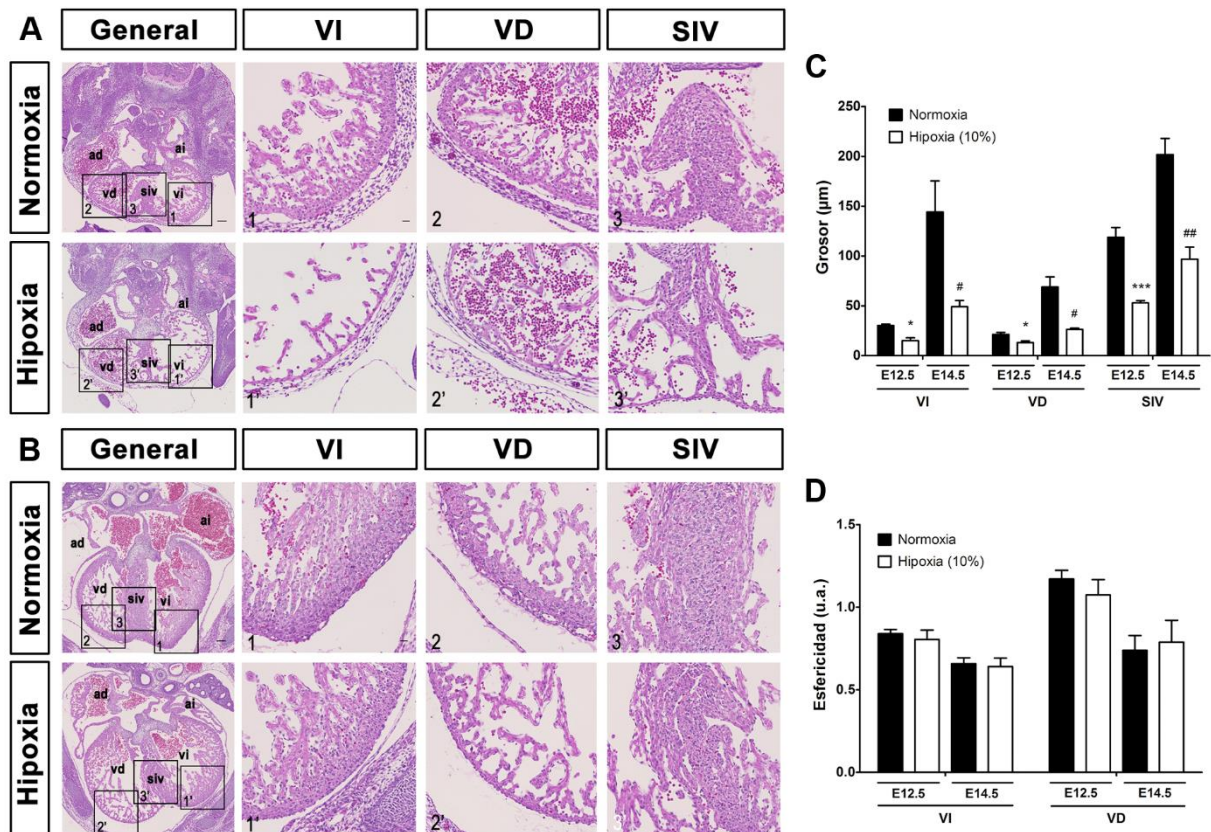


Figura 13 – Efectos cardiacos de la exposición a hipoxia durante la gestación

A) Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones a E12.5 de embriones en normoxia (arriba) y de embriones mantenidos las 48 horas previas al sacrificio al 10% de O₂ (abajo). Las barras de escala representan 100μm (general) y 20μm (recuadros). **B)** Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones a E14.5 de embriones en normoxia (arriba) y de embriones mantenidos las 48 horas previas al sacrificio al 10% de O₂ (abajo). Las barras de escala representan 100μm (general) y 20μm (recuadros). **C y D)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (C) y de la esfericidad de los ventrículos (D) en embriones en normoxia (barras negras) y en hipoxia (barras blancas). Las barras representan media±SEM (n=3) * o # p<0.05, ** o ## 0.005<p<0.01, *** o ### p<0.005, test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Por otro lado, para determinar la contribución directa de HIF1 α al fenotipo observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* se generó una nueva línea doble mutante *Hif1 α /Vhl* en progenitores NKX2.5 (*Hif1 α ^{f/f}/Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*, en adelante *Hif1 α /Vhl/Nkx2.5*). En primer lugar, mediante PCR cuantitativa se confirmó una buena eficiencia de recombinación en ambos genes (Fig. 14A). Curiosamente, al prevenir el aumento de HIF1 α tras la delección de *Vhl* mediante la doble delección, no se observaron alteraciones morfológicas del corazón a E14.5 (Fig. 14B) y se rescataron todos los defectos estructurales presentes en el mutante simple de *Vhl*. Los dobles mutantes *Hif1 α /Vhl/Nkx2.5* presentaron grosores similares

tanto del MC como del SIV (Fig. 14C), así como una forma normal de los ventrículos, sin cambios en la esfericidad de los mismos (Fig. 14D). Este rescate del fenotipo observado demuestra que es necesaria una regulación espacial y temporal de la señalización mediada por HIF1 durante las etapas intermedias de la cardiogénesis, con un descenso progresivo en los niveles de HIF1 α en las etapas centrales de la gestación, así como su confinamiento al MC, para el correcto desarrollo del corazón embrionario.

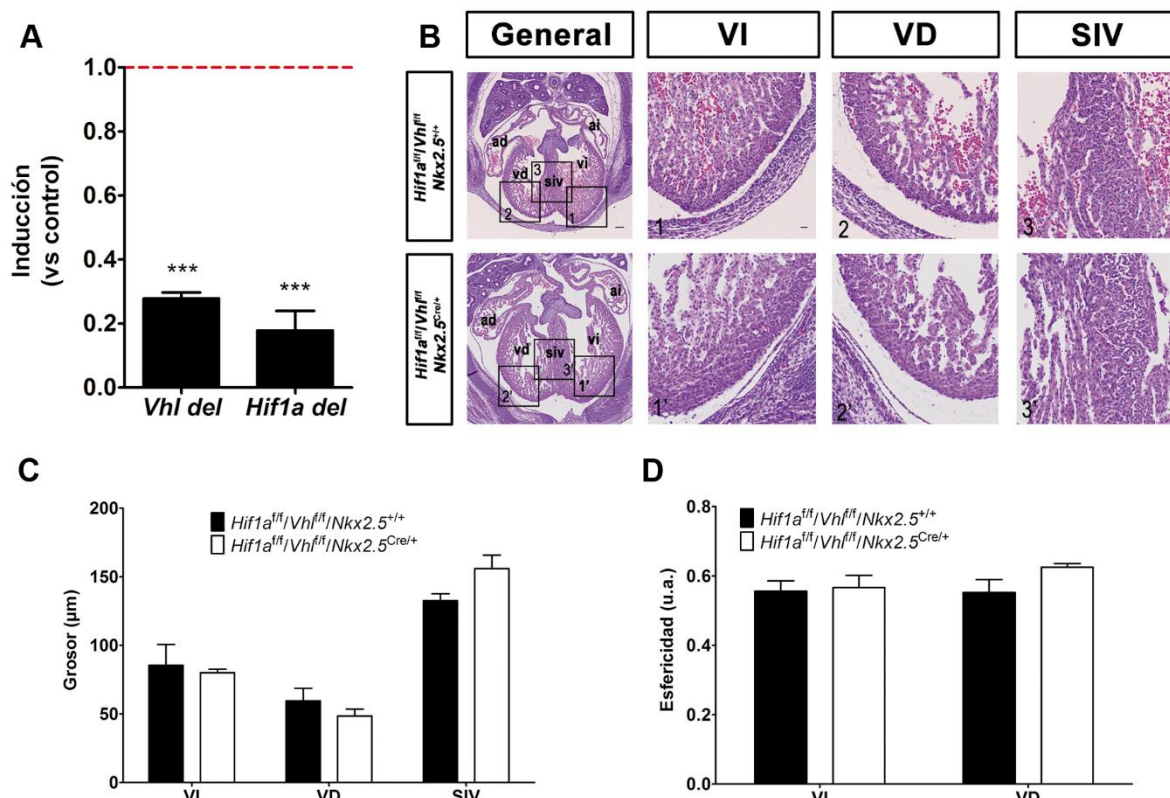


Figura 14 – Doble delección de *Hif1a* y *Vhl* en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos

A) Cuantificación por PCR cuantitativa de los transcritos de *Vhl* y *Hif1a*. La amplificación es específica para la región floxeada, en ventrículos a E14.5 deficientes en *Vhl* y *Hif1a*. Las barras representan la inducción relativa a la expresión basal (línea roja) en los controles hermanos de camada (media \pm SEM, n=3). ***p<0.005, test t de Student. **B)** Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones a E14.5 de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, arriba) y dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, abajo). Las barras de escala representan 100 μ m (general) y 20 μ m (recuadros). **C y D)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (C) y de la esfericidad de los ventrículos (D) en embriones control (barras negras) y dobles mutantes (barras blancas). Las barras representan media \pm SEM (n=3), test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular

2.1.1 Análisis de los efectos de la delección de *Vhl* a nivel de progenitores cardiacos

Debido a que *Nkx2.5* se expresa tempranamente en los progenitores de la cresta cardiaca, parte de los defectos cardiacos observados podrían deberse a defectos a nivel de progenitor en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Para determinar si el fenotipo observado se debía a un efecto directo de HIF1 α sobre los cardiomiocitos embrionarios o si bien existía afectación de los progenitores cardiacos NKX2.5⁺, se analizaron embriones a E10.5. No se observaron defectos estructurales aparentes entre los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (panel inferior) respecto a los controles (panel superior) (Fig. 15A). Tampoco se observaron

diferencias en la tasa de proliferación del miocardio, medida mediante inmunofluorescencia para el marcador de mitosis KI67 (Figs. 15B y 15C), ni en los niveles de expresión de *Nkx2.5* por hibridación *in situ* (Fig. 15D).

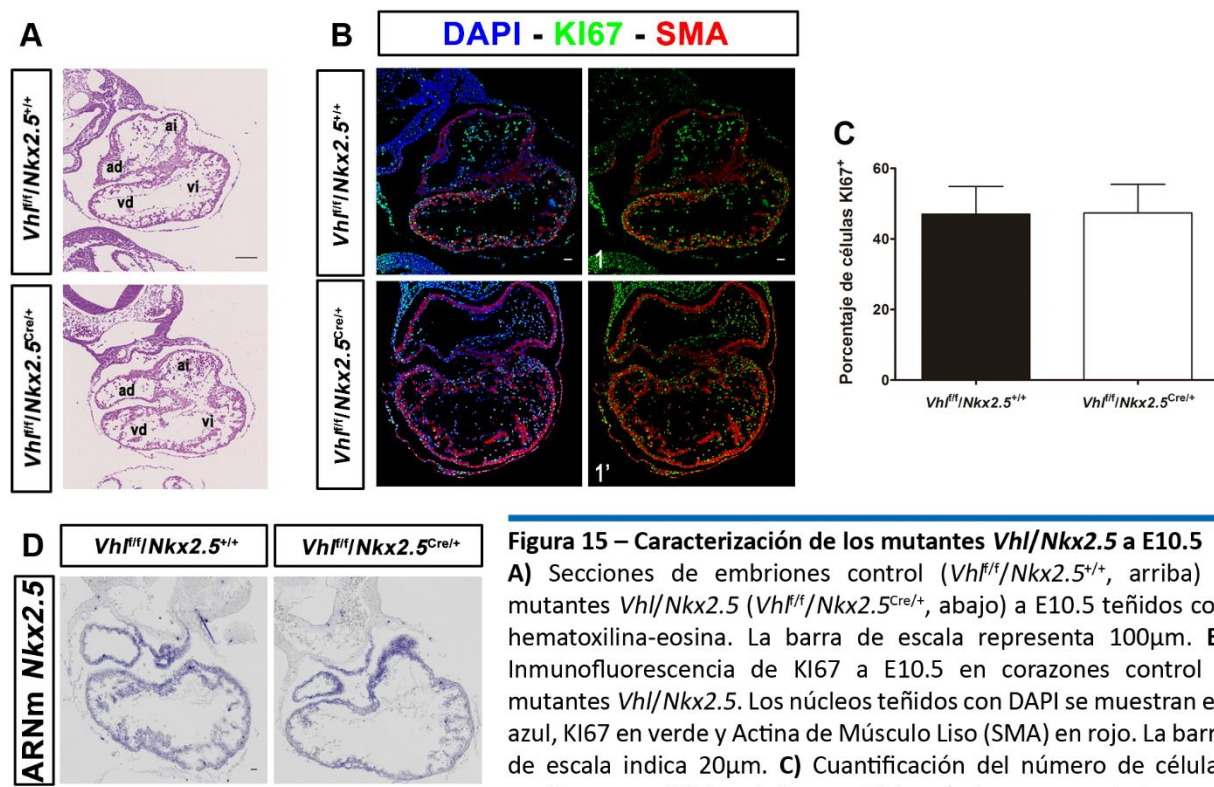


Figura 15 – Caracterización de los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E10.5

A) Secciones de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, arriba) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, abajo) a E10.5 teñidos con hematoxilina-eosina. La barra de escala representa 100µm. **B)** Inmunofluorescencia de KI67 a E10.5 en corazones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, KI67 en verde y Actina de Músculo Liso (SMA) en rojo. La barra de escala indica 20µm. **C)** Cuantificación del número de células positivas para KI67 en la inmunohistoquímica, representado como porcentaje de células en el miocardio ventricular. Las barras indican media±SEM para el control (barras negras) y el mutante *Vhl/Nkx2.5* (barras blancas). La barra de escala indica 20µm. n=3, test t de Student. **D)** Hibridación *in situ* del ARNm de *Nkx2.5* en embriones control (izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (derecha) a E10.5. La barra de escala indica 20µm.

2.1.2 Análisis del desarrollo de la vasculatura coronaria en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Por otro lado, debido a que los progenitores NKX2.5 también contribuyen parcialmente al endocardio y al epicardio, podría existir una relación entre el adelgazamiento del MC observado y la existencia de defectos vasculares en la vasculatura coronaria en formación. Mediante inmunohistoquímica contra CD31 (Fig. 16A) se determinó que, en efecto, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaban un menor número de células CD31⁺ por área de tejido (Fig. 16B) y un menor diámetro de la arteria coronaria derecha (Fig. 16C). Esto indica que podría existir un componente vascular que contribuyese al fenotipo observado.

2.1.3 Análisis del tamaño de los cardiomiocitos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Con el objetivo de determinar si la delección de *Vhl* en el linaje *Nkx2.5* tenía algún efecto sobre el tamaño de los cardiomiocitos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* se determinó el tamaño celular mediante tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA, del inglés *Wheat Germ Agglutinin*), que marca la membrana celular (Fig. 17A). La cuantificación mostró que el tamaño de los cardiomiocitos no presentaba diferencias

significativas entre genotipos (Fig. 17B), por lo que el adelgazamiento observado no es debido a una diferencia en el tamaño de los cardiomiocitos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*.

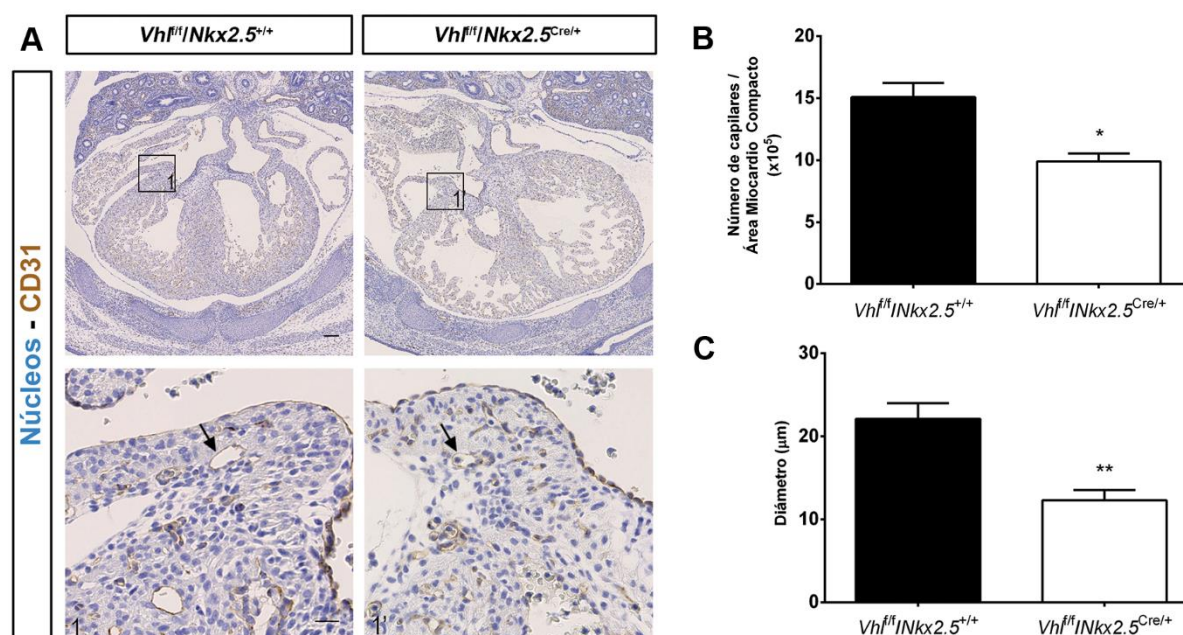


Figura 16 – Alteraciones coronarias en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5

A) Secciones de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) teñidas para CD31 a E14.5. Los recuadros muestran la arteria coronaria derecha (flecha negra). Las barras de escala indican 100μm en la vista general y 20μm en los recuadros. **B)** Cuantificación de las células CD31⁺ en el miocardio compacto de los embriones control (barra negra) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (barra blanca). Los valores están normalizados según el área total del miocardio compacto (n=3). **C)** Cuantificación del diámetro de la arteria coronaria derecha en embriones control (barra negra) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (barra blanca) (n=4 para controles y n=3 para mutantes). Para todas las gráficas las barras indican media±SEM; *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student.

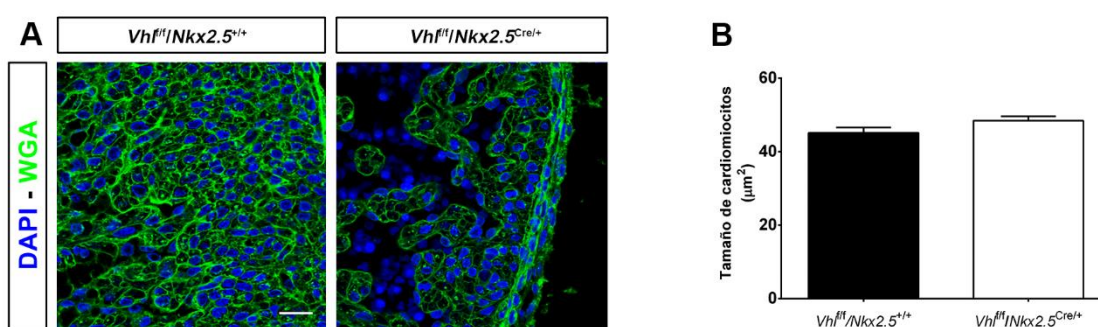


Figura 17 - Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5

A) Secciones de corazones a E14.5 de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) teñidos con aglutinina de germen de trigo (WGA, en verde) y con DAPI para la detección de núcleos (azul). Las imágenes muestran la pared lateral del ventrículo izquierdo. La barra de escala representa 20μm. **B)** Cuantificación del área transversal de los cardiomiocitos en las tinciones con WGA en embriones control (barra negra) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (barra blanca). Las barras representan media±SEM (n=3).

2.1.4 Deleción específica de *Vhl* en cardiomiocitos: *TnTc-Cre*

Para valorar de manera directa el efecto de la pérdida de *Vhl* en cardiomiocitos y discriminar posibles efectos de la deleción por la contribución del linaje *Nkx2.5* en epicardio y endocardio, se generó un

modelo de delección de *Vhl* específico de cardiomiocitos, empleando una Cre recombinasa controlada por el promotor del gen de la troponina T cardíaca (*TnTc*) (Jiao y cols., 2003): *Vhl^{f/f}/TnTc^{Cre/+}*, en adelante *Vhl/TnTc*. La delección de *Vhl* específica en cardiomiocitos también resultó en una distribución homogénea de HIF1α en todo el miocardio, así como en su expresión persistente a E14.5 (Fig. 18A). La caracterización histológica a E14.5 mostró que los mutantes *Vhl/TnTc* recapitulaban el fenotipo observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 18B), tanto a nivel de adelgazamiento del MC (Fig. 18C) como de la dilatación ventricular (Fig. 18D). Por otra parte, la delección mediante el empleo de la *TnTc*-Cre también provocó letalidad embrionaria (Tabla 9).

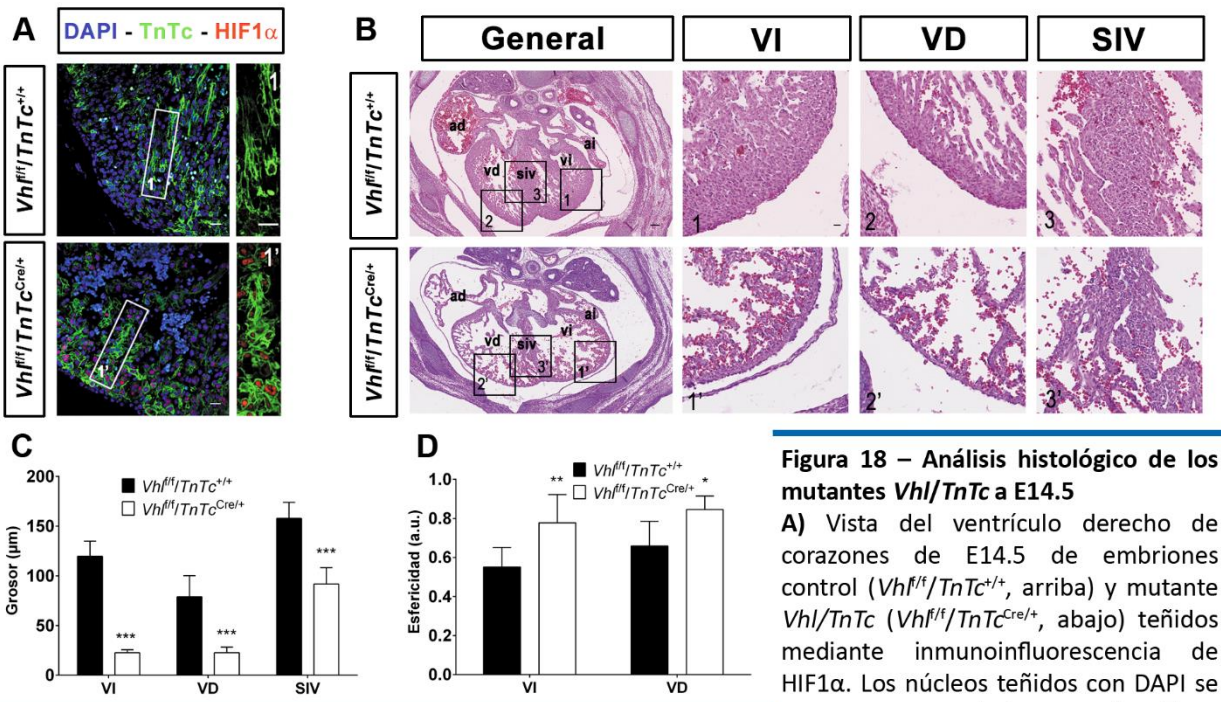


Figura 18 – Análisis histológico de los mutantes *Vhl/TnTc* a E14.5

A) Vista del ventrículo derecho de corazones de E14.5 de embriones control (*Vhl^{f/f}/TnTc^{+/+}*, arriba) y mutante *Vhl/TnTc* (*Vhl^{f/f}/TnTc^{Cre/+}*, abajo) teñidos mediante inmunofluorescencia de HIF1α. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, la troponina T en verde y HIF1α en rojo. La barra de escala indica 20μm. Los rectángulos muestran ampliaciones de la pared ventricular B) Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones a E14.5 de embriones control (arriba) y mutantes *Vhl/TnTc* (abajo). Las barras de escala representan 100μm (general) y 20μm (recuadros). C,D) Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (C) y de la esfericidad de los ventrículos (D) en embriones control (barras negras) y mutantes (barras blancas). Las barras representan media±SEM (n=3) *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Estadio	<i>Vhl^{f/f}/TnTc^{Cre/+}</i>	Total	Camadas	% Real	% Esperado	p-valor
E14.5	14	83	11	16.87±5.9	25	0.260
Destete	0	67	10	0.00±0.0	25	1.594x10 ⁻⁵

Tabla 9 – Análisis de recuperación de mutantes *Vhl/TnTc*

Para cada estadio, la tabla muestra el número de embriones mutantes *Vhl/TnTc* (*Vhl^{f/f}/TnTc^{Cre/+}*) recuperados, el total de embriones/crías recuperados y el número de camadas analizadas. El porcentaje de mutantes recuperados, mostrado como media±SEM, y el porcentaje de recuperación esperado (25%) se compararon mediante el test de rangos de Wilcoxon

Además, el análisis vascular de los mutantes *Vhl/TnTc* (Fig. 19A) no mostró diferencias ni en el número de células CD31⁺ (Fig. 19B) ni en el diámetro de la arteria coronaria derecha (Fig. 19C) respecto a los embriones control. En conjunto, estos resultados excluyen un efecto de la delección de *Vhl* a nivel de progenitor en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, indicando también que los defectos vasculares observados no son probablemente la principal causa de las alteraciones detectadas en el miocardio, ya que la delección en cardiomiocitos, que no presenta estas alteraciones vasculares, recapitula los mismos defectos, lo cual sugiere que las alteraciones por la pérdida de *Vhl* ocurren de manera autónoma a nivel de cardiomiocito.

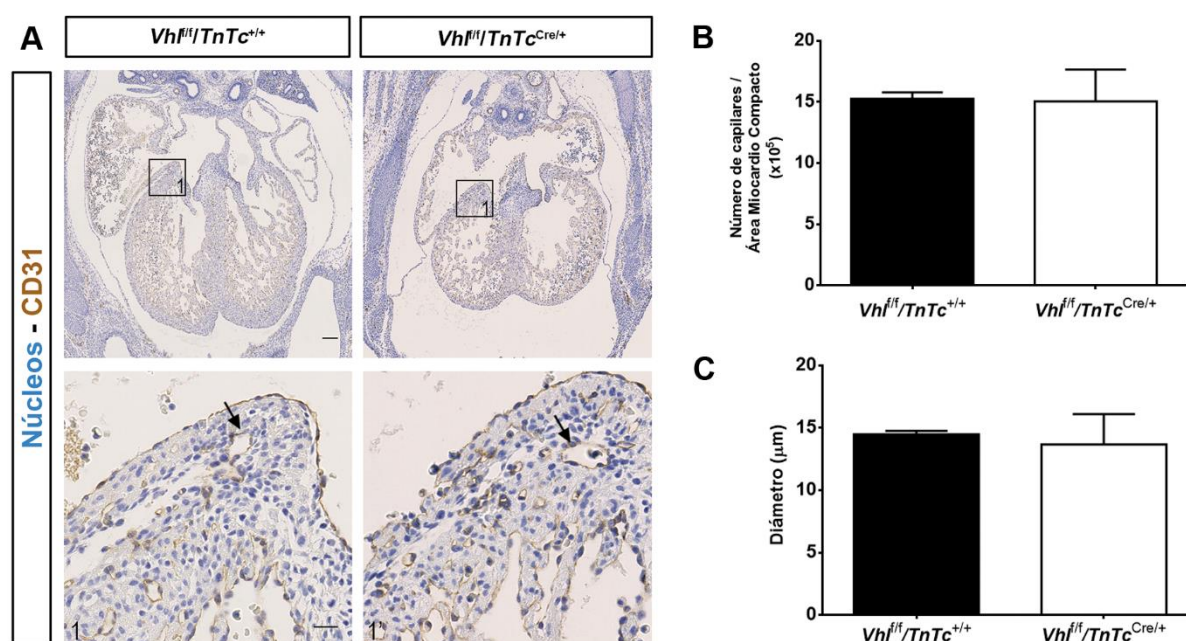


Figura 19 – Alteraciones coronarias en los mutantes *Vhl/TnTc* a E14.5
A) Secciones de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/TnTc^{+/+}*) y mutante *Vhl/TnTc* (*Vhl^{fl/fl}/TnTc^{Cre/+}*) teñidas para CD31 a E14.5. Los recuadros muestran la arteria coronaria derecha (flecha negra). Las barras de escala indican 100μm en la vista general y 20μm en los recuadros. **B)** Cuantificación de las células CD31⁺ en el miocardio compacto de los embriones control (barra negra) y mutante *Vhl/TnTc* (barra blanca). Los valores están normalizados según el área total del miocardio compacto (n=3). **C)** Cuantificación del diámetro de la arteria coronaria derecha en embriones control (barra negra) y mutante *Vhl/TnTc* (barra blanca) (n=3). Para todas las gráficas las barras indican media±SEM; test t de Student.

2.2 Análisis de expresión génica en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Con el objetivo de identificar las alteraciones moleculares provocadas por la deficiencia de *Vhl* en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, se llevó a cabo un análisis de expresión mediante RNASeq. Para ello, se aislaron corazones de embriones mutantes y controles hermanos de camada a E12.5, para tratar de determinar las alteraciones primarias antes de la completa aparición de las alteraciones morfológicas, que tienen lugar a E14.5. Con el objetivo de reducir la variabilidad y centrarnos en la expresión de genes en las cámaras ventriculares, se retiró la parte auricular y del tracto de salida, así como la parte superior de los ventrículos, para evitar contaminación por otros tipos celulares, como los cojines endocárdicos que darán lugar a las futuras válvulas atrioventriculares. Asimismo, teniendo en cuenta que en estos

primeros estadios embrionarios la expresión génica es muy dinámica en cortos periodos de tiempo, se seleccionaron parejas control-mutante de la misma camada con número similar de somitos (Tabla 10).

Muestra	Genotipo	Somitos	RIN
1	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	10
2	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	10
3	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	9.8
4	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	10
5	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	10
6	<i>Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	10

Tabla 10 – Muestras empleadas en el análisis de RNASeq

Para cada muestra la tabla presenta el genotipo del embrión (control *Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}* o mutante *Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*, primera columna), el número de somitos (segunda columna) y el valor RIN (tercera columna), indicativo de la calidad del ARN obtenido a partir de esa muestra, en una escala de 1 a 10.

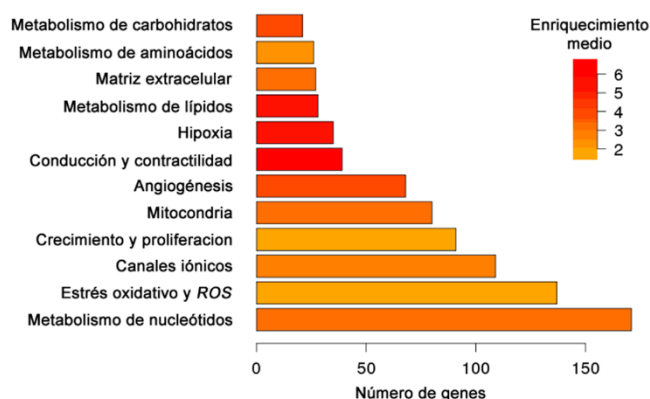


Figura 20 – Análisis de términos de Ontología Génica en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica mediante GOrrilla contra la base de datos de Procesos Biológicos. La longitud de las barras es proporcional al número de genes asociados a cada una de las 12 categorías definidas *ad hoc* a partir de los términos enriquecidos ($p < 0.001$) identificados por GOrrilla. El color de las barras representa el enriquecimiento relativo medio en el mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) respecto a su control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*).

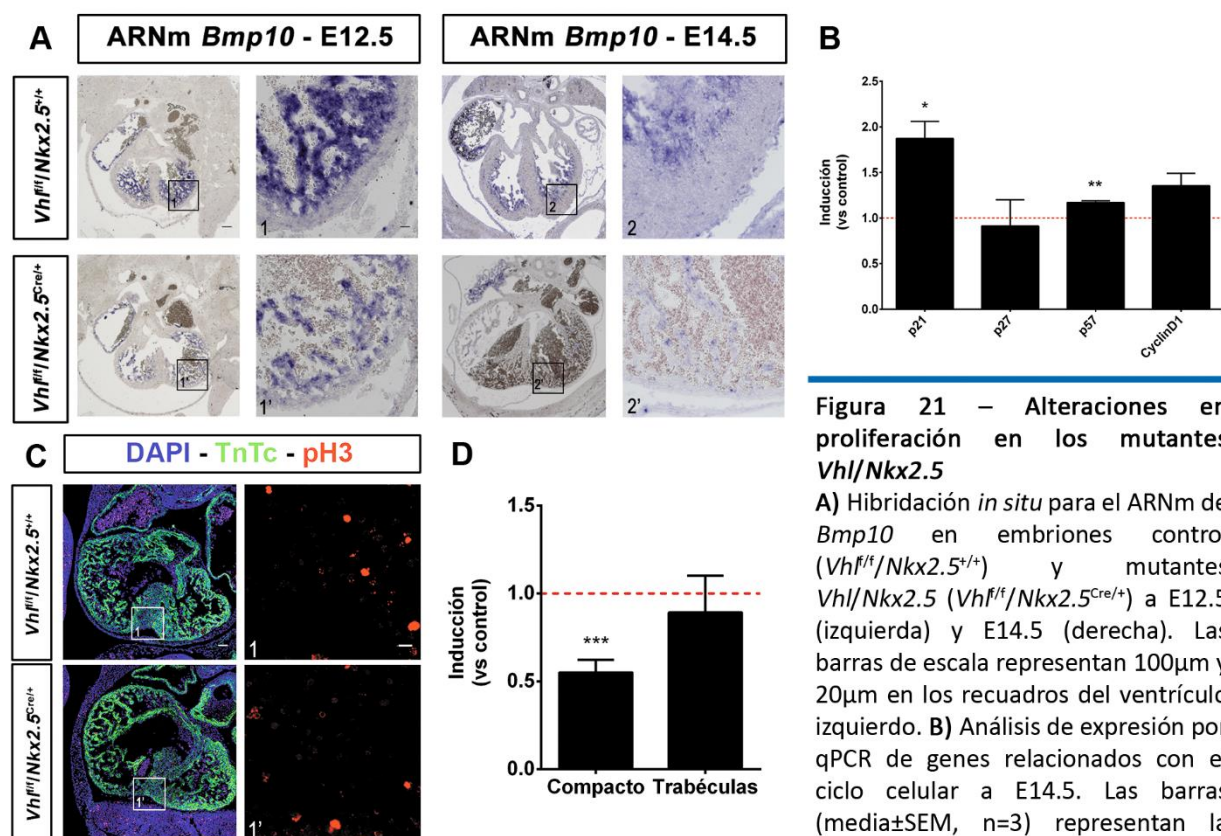
Como resultado del análisis se obtuvo un total de 13408 genes codificantes de proteínas, de los cuales 848 mostraron expresión diferencial, considerando una diferencia significativa en la expresión a $p\text{-valor} < 0.05$, ajustados mediante el método de Benjamini-Hochberg. De los 848 genes, 556 presentaron expresión incrementada en el mutante *Vhl/Nkx2.5* respecto al control, mientras que 292 genes presentaron expresión reducida. Para tratar de determinar los posibles procesos biológicos alterados se realizó un análisis de Enriquecimiento de Términos de Ontología Génica (GO, del inglés *Gene Ontology*). Los resultados mostraron cambios en procesos

relacionados con la respuesta celular a la hipoxia, así como aquellos relacionados con el desarrollo vascular y angiogénesis, consistente con la ganancia de función de la ruta de hipoxia tras la delección de *Vhl* (Fig. 20). Además de estos cambios esperados, se detectaron alteraciones en procesos relacionados con metabolismo, función mitocondrial, proliferación, transporte de iones y contractilidad/conducción.

2.3 Análisis de la proliferación en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

En el análisis por GO se detectó una importante variación en procesos relacionados con proliferación. En concreto, mediante el análisis por RNASeq a E12.5 se detectó expresión incrementada de varios genes relacionados con parada de ciclo celular e inhibición de proliferación, como el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 1A (*Cdkn1a* o *p21*, del inglés *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*), de la ciclina G2 (*Ccng2*) del transcrito inducible por daño en el ADN 4 (*Ddit4*, del inglés *DNA-Damage-Inducible Transcript 4*) o del inhibidor del receptor ERBB 1 (*Errfi1*, del inglés *ERBB Receptor Feedback*

Inhibitor 1). Por otro lado, el análisis de expresión mediante hibridación *in situ* a E12.5 y E14.5 del gen que codifica para la proteína morfogenética ósea 10 (*Bmp10*, del inglés *Bone Morphogenetic Protein 10*) mostró una expresión reducida en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 21A). Puesto que se ha descrito que *Bmp10* media la represión transcripcional del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 1C (*Cdkn1c* o *p57*, del inglés *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C*) en el MC (Chen y cols., 2004), un inhibidor del ciclo celular, se determinó la expresión de genes relacionados con parada de ciclo y proliferación mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostraron una inducción significativa de *p57* y confirmaron la inducción de *p21* (Fig. 21B). Además, se determinó el número de células proliferantes a E14.5 mediante tinción contra la histona H3 fosforilada (pH3), un marcador de la fase M (mitosis) del ciclo celular (Fig. 21C). La cuantificación de la proporción de células positivas confirmó el descenso en proliferación en el MC de los mutantes *Vhl/Nkx2.5* respecto a los controles, mientras que las trabéculas, al ser estructuras con una baja tasa de proliferación, no presentaron diferencias significativas (Fig. 21D). Estos resultados confirman que el adelgazamiento del MC observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* es debido, al menos en parte, a un descenso en la actividad proliferativa de los cardiomiocitos.



en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). * $p < 0.05$, ** $0.005 < p < 0.01$, test t de Student. **C)** Inmunofluorescencia contra la Histona 3 fosforilada (pH3) a E12.5 en corazones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, Troponina T en verde y pH3 en rojo. Las barras de escala representan 200µm y 50µm en los reduadros (1, 1'). **D)** Cuantificación del número de células positivas para pH3 en la inmunofluorescencia, representado como inducción en el mutante *Vhl/Nkx2.5* respecto a los niveles basales en controles hermanos de camada (línea roja). Las barras representan media±SEM (n=3). En todos los gráficos las barras representan media±SEM, n=3. * $p < 0.05$, ** $0.005 < p < 0.01$, *** $p < 0.005$, test t de Student.

2.4 Análisis metabólico de los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Entre las diferentes alteraciones metabólicas detectadas por el análisis de GO, una de las más evidentes fue el marcado incremento en la expresión de genes relacionados con procesos metabólicos de los hidratos de carbono, principalmente aquellos genes que participan en catabolismo y en la glucólisis (Fig. 22A). Además, este incremento a nivel transcripcional de genes glucolíticos estaba acompañado de una fuerte inhibición en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, principalmente en aquellos involucrados en el transporte y degradación de lípidos (Fig. 22B).

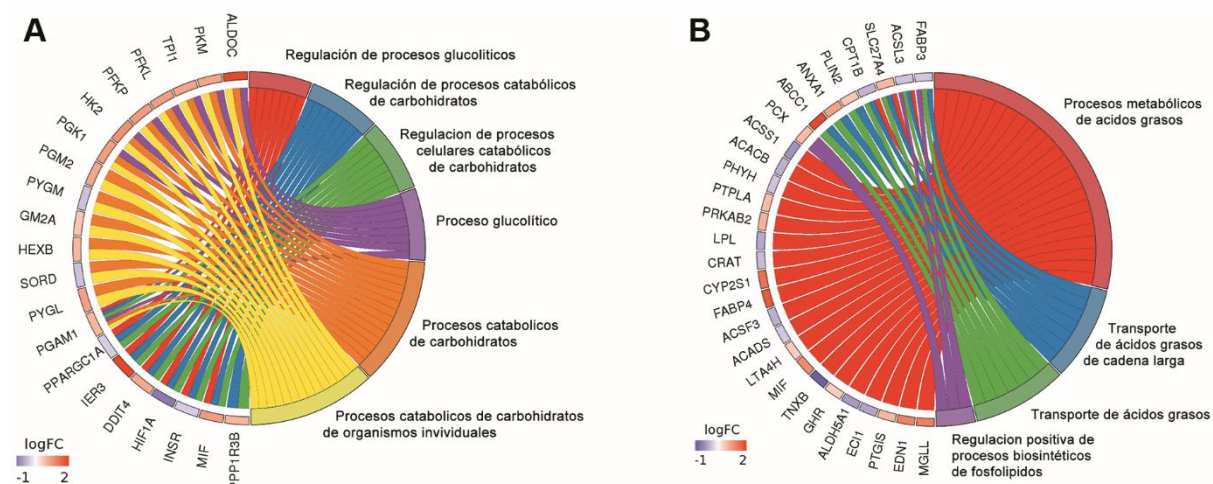
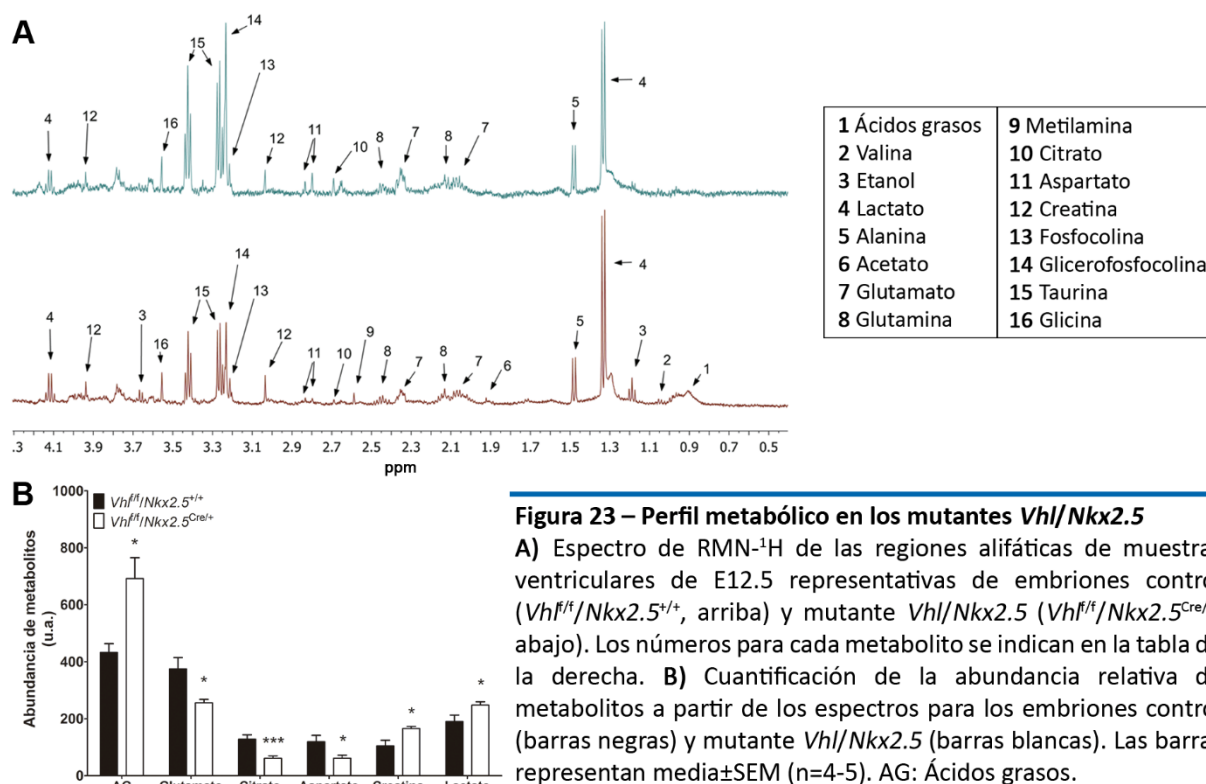


Figura 22 – Alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría “Metabolismo de carbohidratos” con sus términos de Ontología Génica asociados. **B)** Genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría “Metabolismo de lípidos” con sus términos de Ontología Génica asociados. En ambos paneles los cambios en la expresión se presentan para el mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) relativos al control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) y están codificados por color según su inducción (logFC).

Con el objetivo de determinar si estas alteraciones transcripcionales se traducían en alteraciones a nivel del metabolismo celular, se realizó un estudio metabolómico mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H) sobre tejido ventricular de corazones a E12.5, recolectado con los mismos criterios que el material usado en el RNASeq, para determinar diferencias en los perfiles metabólicos entre embriones control y mutante *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 23A). La cuantificación de los espectros (Fig. 23B) mostró que los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaban una acumulación de lactato y creatina, así como una disminución en los niveles de citrato. Estas alteraciones estaban acompañadas de un marcado incremento en la abundancia de ácidos grasos. Así pues, la firma metabólica observada en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* es consistente con el perfil transcripcional observado: acumulación de lactato y disminución de los niveles de citrato debido a la glucólisis incrementada y bloqueo del metabolismo oxidativo por aumento de la *Pdk1*, y acumulación de ácidos grasos causada por la inhibición del programa catabólico de los mismos a nivel transcripcional.



2.4.1 Alteraciones en el metabolismo de la glucosa en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Debido al papel activador que HIF1 α ejerce sobre los genes glucolíticos, el incremento de HIF1 α podría ser la causa directa de la glucolisis incrementada en estos mutantes. Para determinar si HIF1 α media la activación de estos genes en el miocardio embrionario, se analizó la expresión de *Glut1*, *Pdk1* y *Ldha* por hibridación *in situ* a E12.5 y E14.5 en embriones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 24A). Los resultados mostraron una clara expansión a las trabéculas de la expresión de *Glut1*, *Pdk1* y *Ldha* junto con una expresión mantenida de estos genes a E14.5 en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, siguiendo un patrón similar al de HIF1 α en estos mutantes (Figs. 10C,D).

Paralelamente, se comprobó el incremento en la expresión de genes glucolíticos en los mutantes a E14.5 mediante qPCR (Fig. 24B). Este aumento y expansión a las trabéculas también se confirmó mediante inmunofluorescencia para GLUT1, donde la señal para el transportador está incrementada y expandida a las trabéculas en el mutante *Vhl/Nkx2.5* a E14.5 (Fig. 24C, paneles de la izquierda). Por otro lado, el análisis por inmunofluorescencia de la distribución de GLUT1 en los mutantes *Vhl/TnTc* a E14.5 mostró un patrón similar al observado para los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 24C, paneles de la derecha), indicando que, de nuevo, los efectos de la delección de *Vhl* ocurren a nivel autónomo en los cardiomiocitos y no son debidos a efectos secundarios por alteraciones en el endocardio o en el epicardio tras la recombinación dirigida por *Nkx2.5*. Además, la inducción de HIF1 α en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* resultó en la disminución de la expresión de genes implicados en la glucogenolisis, como la glucógeno fosforilasa (*Pygm*) e incrementó la expresión de aquellos relacionados con la glucogenogénesis, como la glucógeno

sintasa 1 (*Gys1*) o la enzima ramificadora de glucanos (*Gbe1*). Estas alteraciones transcripcionales se confirmaron por detección de gránulos de glucógeno en el miocardio de los corazones mutantes respecto a los controles mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Fig. 24D).

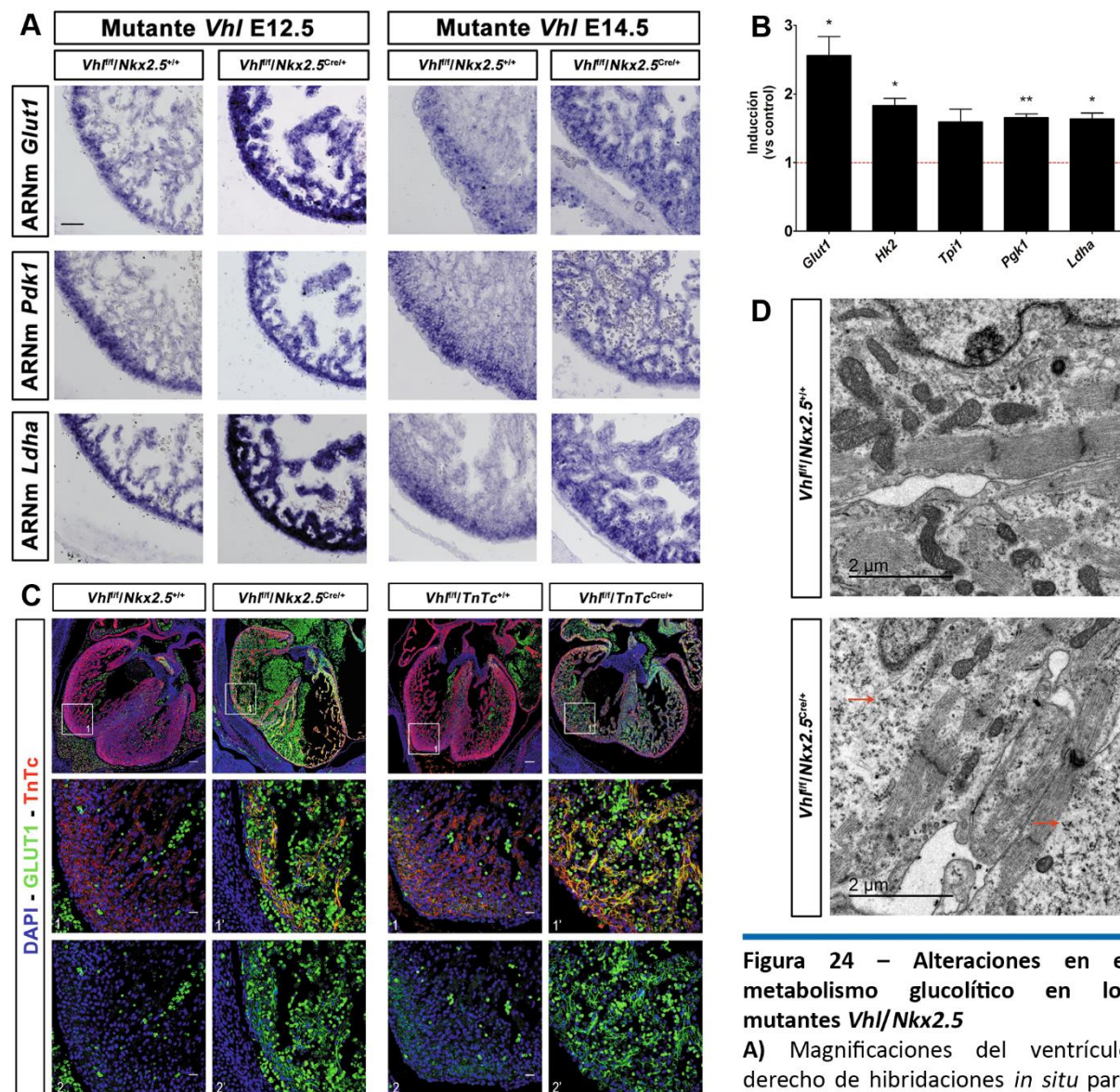


Figura 24 – Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Magnificaciones del ventrículo derecho de hibridaciones *in situ* para *Glut1* (arriba), *Pdk1* (centro) y *Ldha*

(abajo) en embriones control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/-}*) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha). Las barras de escala representan 20µm. **B)** Análisis de expresión por qPCR de genes glucolíticos a E12.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción en el mutante *Vhl/Nkx2.5* en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student. **C)** Inmunofluorescencia de GLUT1 en secciones de E14.5 de embriones control y mutante *Vhl/Nkx2.5* (izquierda) y de embriones control (*Vhl^{f/f}/TnT^{+/-}*) y mutante *Vhl/TnT* (*Vhl^{f/f}/TnT^{Cre/+}*, derecha). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo. Las barras de escala representan 100µm y 20µm en los recuadros del ventrículo derecho. **D)** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (arriba) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (abajo). Las flechas rojas indican gránulos de glucógeno.

El incremento en los niveles de GLUT1 y su extensión a las trabéculas también se observó en los embriones sometidos a tratamiento de hipoxia durante 48 horas, tanto a E12.5 (Fig. 25A, izquierda) como a E14.5 (Fig. 25A, derecha). Sin embargo, en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* los niveles de

GLUT1 detectados mediante inmunofluorescencia a E14.5 eran significativamente menores, y casi indetectables, a diferencia de los controles hermanos de camada (Fig. 25B). Además, la detección del ARNm de *Glut1*, *Pdk1* y *Ldha* mediante hibridación *in situ* mostró un descenso dramático en la expresión de estos genes glucolíticos en el MC de los dobles mutantes, sin cambios en la expresión a nivel trabecular (Fig. 25C). La inhibición de la ruta glucolítica en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* también se confirmó mediante PCR cuantitativa a E14.5 (Fig. 25D).

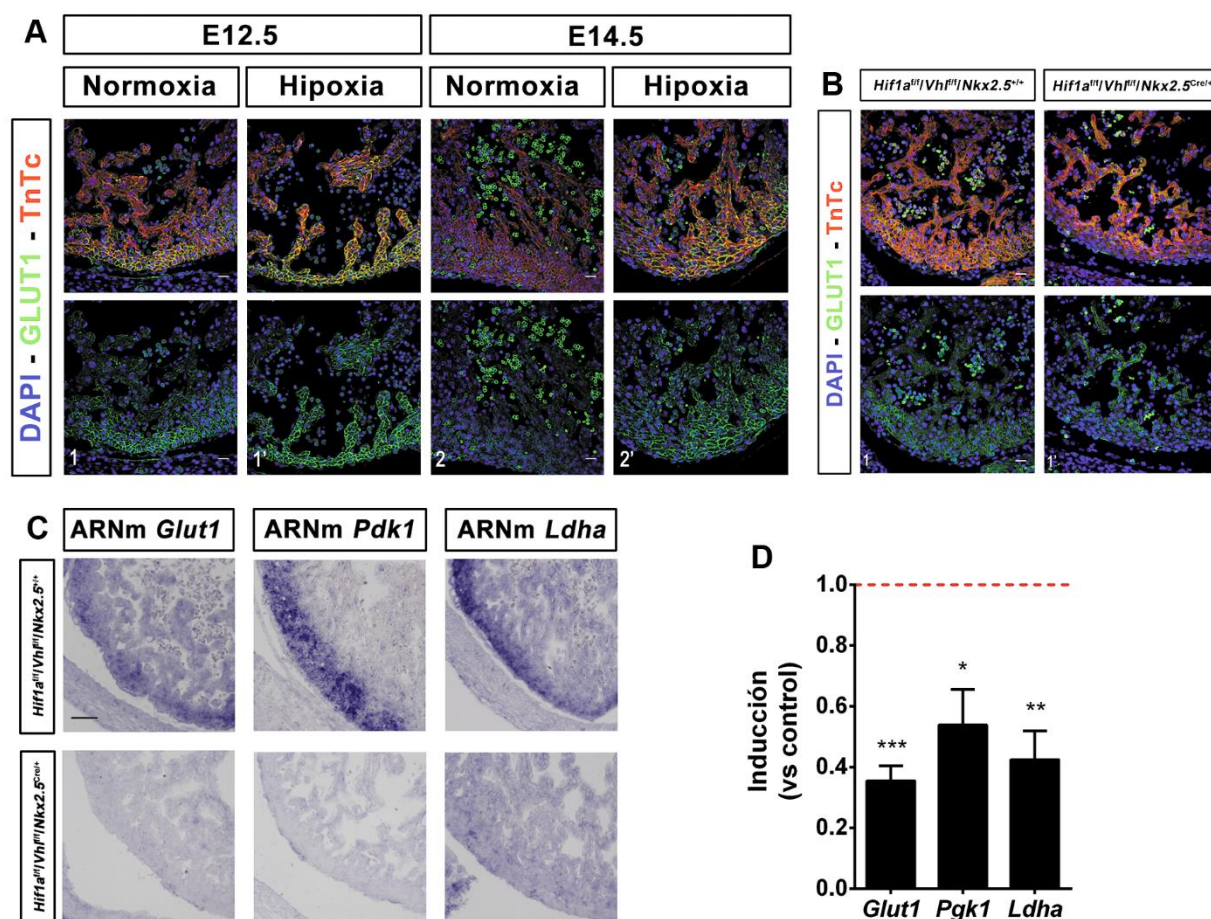


Figura 25 - Alteraciones en el metabolismo glucolítico tras exposición a hipoxia y en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*

A) Inmunofluorescencia de GLUT1 en secciones de corazón de embriones en normoxia y de embriones mantenidos las 48 horas previas al sacrificio al 10% de O₂ a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo. **B)** Inmunofluorescencia de GLUT1 en secciones de corazón de E14.5 de embriones control (*Hif1a^{f/f}/Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) y dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (*Hif1a^{f/f}/Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo. **C)** Hibridación *in situ* para los ARNm de *Glut1* (izquierda), *Pdk1* (centro) y *Ldha* (derecha) en embriones control y dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* a E14.5. En todos los casos (A, B y C) las imágenes muestran magnificaciones del ventrículo derecho y las barras de escala representan 20μm. **D)** Análisis de expresión por qPCR de genes glucolíticos a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción en el doble mutante en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, test t de Student.

En conjunto, estos resultados muestran la importancia de la restricción de HIF1α al MC en el establecimiento de los compartimentos glucolíticos en el corazón embrionario en etapas intermedias de la gestación.

2.4.2 Alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Como se ha comentado previamente, la activación glucolítica en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* está acompañada de una inhibición en la expresión de genes relacionados con el catabolismo y transporte de los AG, así como de niveles superiores de AG libres detectados por el ensayo de RMN-¹H en los mutantes de *Vhl/Nkx2.5*, lo que sugiere un descenso de la oxidación de AG.

Para valorar la posible acumulación de AG que sugiere el análisis metabolómico, se analizaron embriones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5* hermanos de camada mediante MET a E14.5 (Fig. 26A). Los resultados mostraron una acumulación significativa de lípidos en el citoplasma de los cardiomiocitos en el mutante, observándose un incremento en el área de gotas lipídicas en ambas capas del miocardio (Fig. 26B). Además, se realizaron ensayos de expresión de genes relacionados con la incorporación, transporte y degradación de ácidos grasos a E14.5. Los resultados indican que el programa catabólico de los ácidos grasos se encuentra fuertemente inhibido en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 26C).

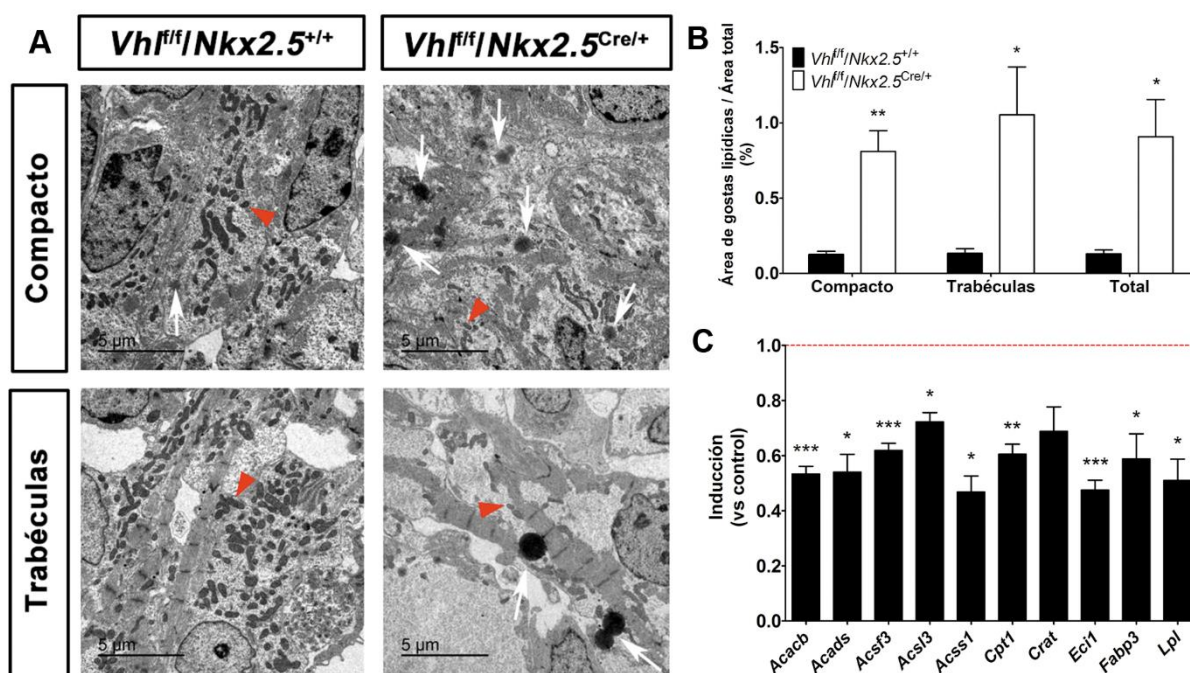


Figura 26 – Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha), tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). Las flechas blancas indican gotas lipídicas. Las puntas rojas señalan mitocondrias representativas. **B)** Porcentaje del área ocupada por gotas lipídicas en relación al área de tejido (media±SEM, n=3) en las fotografías obtenidas mediante MET en embriones de E14.5 control (barras negras) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (barras blancas). *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student. **C)** Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción en el mutante *Vhl/Nkx2.5* en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, test t de Student.

Para determinar el papel de HIF1 en esta reprogramación metabólica, se analizó la acumulación de gotas lipídicas intracelulares en el citoplasma de los cardiomiocitos mediante MET en el doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (Fig. 27A). La cuantificación del área ocupada por las gotas lipídicas (Fig. 27B) mostró que en el caso del doble mutante no existe acumulación de las mismas, ni diferencias respecto a los controles hermanos de camada (Fig. 27B). Además, el análisis de expresión mediante PRC cuantitativa de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos no mostró cambios significativos en la expresión de los mismos en los dobles mutantes (Fig. 27C). Este resultado indica, por tanto, que previniendo el incremento en los niveles de HIF1 α tras la delección de *Vhl* se rescata la inhibición del programa catabólico de los ácidos grasos y plantea un papel esencial de HIF1 α en la regulación de los programas metabólicos del miocardio embrionario.

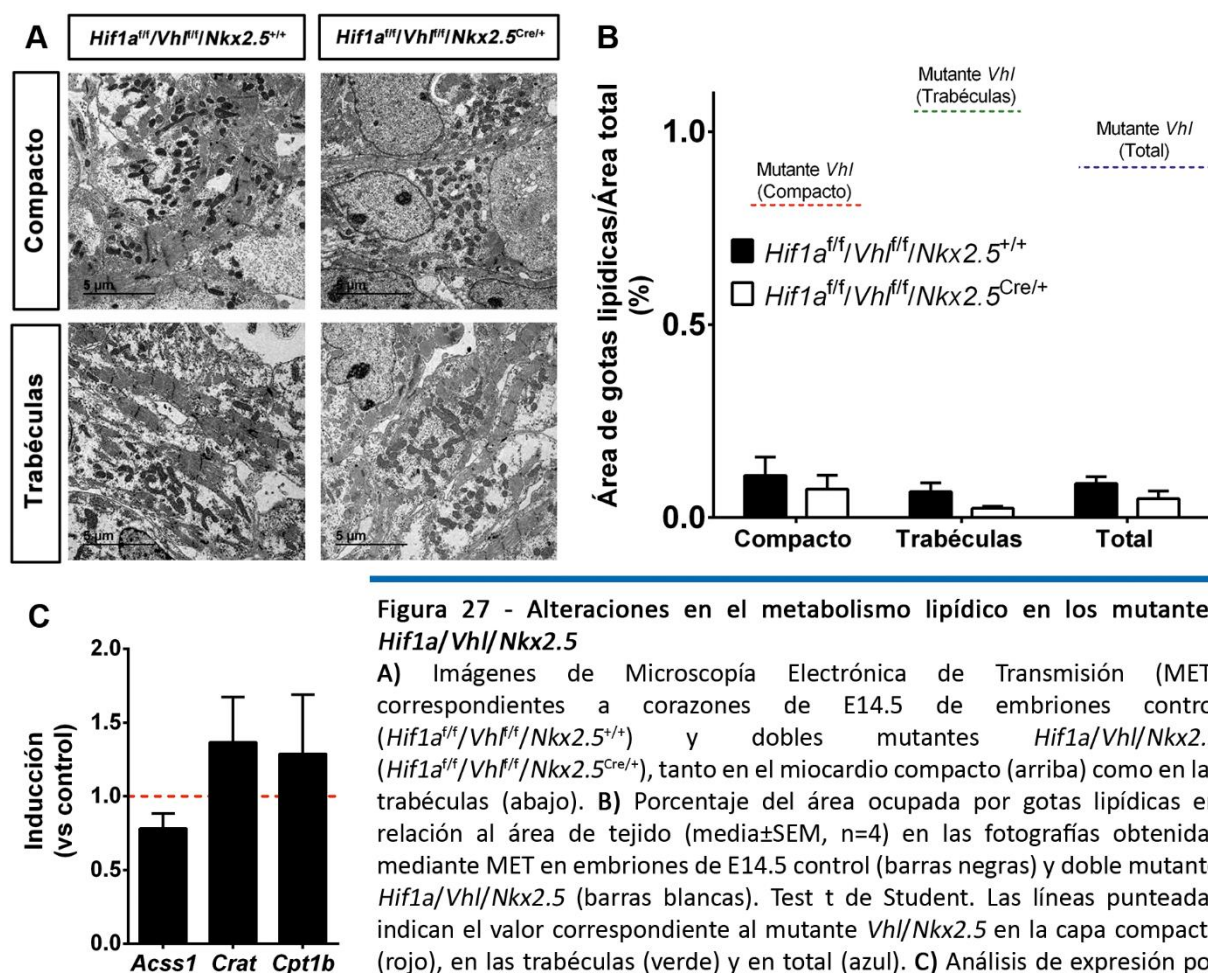


Figura 27 - Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*

A) Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*), tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). **B)** Porcentaje del área ocupada por gotas lipídicas en relación al área de tejido (media \pm SEM, n=4) en las fotografías obtenidas mediante MET en embriones de E14.5 control (barras negras) y doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (barras blancas). Test t de Student. Las líneas punteadas indican el valor correspondiente al mutante *Vhl/Nkx2.5* en la capa compacta (rojo), en las trabéculas (verde) y en total (azul). **C)** Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos a E14.5. Las

barras (media \pm SEM, n=3-6) representan la inducción en el doble mutante en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). Test t de Student.

En conjunto, estos resultados sugieren que el descenso en los niveles de HIF1 α observado en el MC de los embriones control a E14.5 es esencial para el establecimiento de un programa metabólico basado en la oxidación de AG y para la inhibición del programa glucolítico presente en etapas anteriores.

2.4.3 Alteraciones mitocondriales en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

En vista del perfil metabólico observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, y teniendo en cuenta el papel clave de la mitocondria en el metabolismo oxidativo, se esperaría una correlación con el estado mitocondrial en estos mutantes. Como primera aproximación para ese análisis, se realizó una tinción contra la Translocasa de la Membrana Externa mitocondrial (TOM20, del inglés *Translocase of the Outer Membrane*) a E14.5 (Fig. 28A).

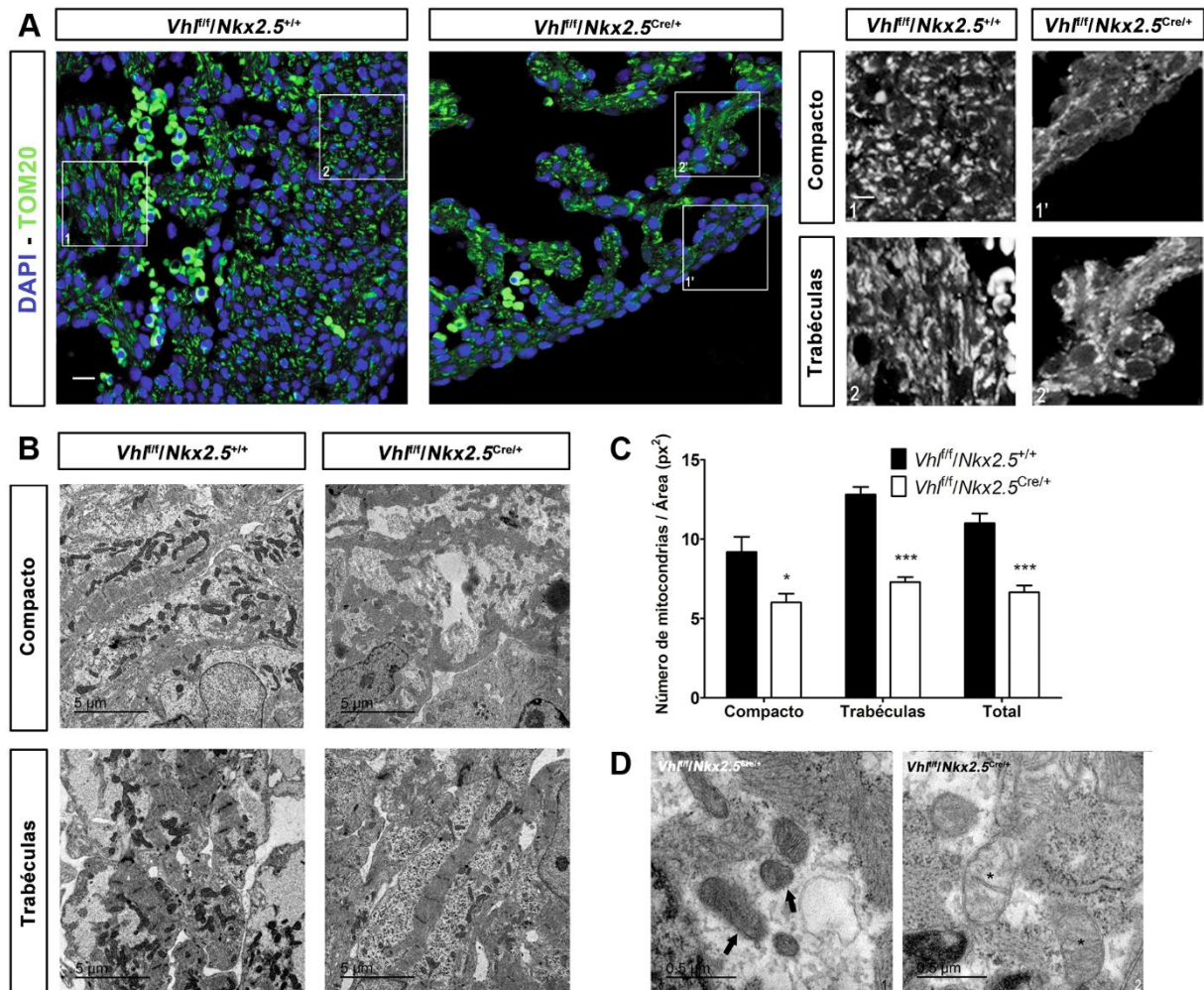


Figura 28 – Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Inmunofluorescencia para TOM20 (verde) en embriones control (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) a E14.5. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul. Las barras de escala representan 20 μ m. Los paneles de la derecha muestran magnificaciones de los recuadros con el canal de TOM20 en gris (barra de escala 10 μ m). **B)** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (derecha), tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). **C)** Cuantificación del número de mitocondrias en las imágenes de MET en embriones control (barras negras) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (barras blancas). Los resultados se expresan como número de mitocondrias por área de tejido (px^2). En todos los casos, se presenta media \pm SEM (n=3), * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, test t de Student. **D)** Imágenes de MET mostrando alteraciones en las mitocondrias de los embriones mutantes a E14.5: “swelling” (izquierda, flechas negras) y baja electrodensidad de la matriz (derecha, asteriscos).

Los resultados mostraron, por un lado, que TOM20 es más abundante en las trabéculas de los embriones control, en comparación con el MC, lo cual se corresponde con la distribución heterogénea de las mitocondrias descritas en el miocardio embrionario (Fig. 9). Por otro lado, se observó que los niveles de TOM20 en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* estaban disminuidos en el MC, mientras que las trabéculas mostraron un patrón punteado, sugerente de disfunción mitocondrial.

Para confirmar esta alteración de la red mitocondrial en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* se analizó el número de mitocondrias a E14.5 mediante MET (Fig. 28B). Mientras que en los embriones control se observó una distribución normal de acuerdo al gradiente descrito previamente (Fig. 9), con un enriquecimiento en el contenido mitocondrial en las trabéculas respecto al MC, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* mostraron un descenso significativo en el número de mitocondrias en ambas capas, sin existir diferencia en el contenido mitocondrial entre el MC y las trabéculas (Fig. 28C). Además, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaban mitocondrias con diversos signos de disfunción, como una reducción en la electrodensidad de la matriz, desorganización de la membrana externa o tumefacción (“swelling”) (Fig. 28D).

Por otro lado, la actividad COX4 estaba reducida en ambas capas del miocardio en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5, en línea con las alteraciones tanto en el número como en la morfología mitocondrial de los mutantes. (Fig. 29A).

Para determinar las bases moleculares de estas alteraciones mitocondriales, se analizaron los genes con expresión diferencial significativa entre embriones control y *Vhl/Nkx2.5* implicados en homeostasis, remodelado y función mitocondrial. A E12.5 los análisis de RNASeq y Ontología Génica mostraron que los corazones deficientes en *Vhl* presentaban una disminución significativa en la expresión del coactivador del receptor peroxisomal gamma (*Pgc1α* o *Ppargc1α*, del inglés *Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ, coactivator 1α*), relacionado con la biogénesis mitocondrial. Además, también se observó un marcado incremento en la expresión del gen que codifica para la Proteína de Interacción con Max (*Mxi1*, del inglés *Max Interacting Protein 1*), implicado en la regulación negativa de la biogénesis mitocondrial a través de la represión de MYC (Zhang y cols., 2007). Además, dos días más tarde en el desarrollo, a E14.5, coincidiendo con la observación de las alteraciones mitocondriales descritas, el análisis de la expresión génica mediante qPCR (Fig. 29B) mostró que los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaban expresión reducida de los genes de fusión mitocondrial mitofusina 1 (*Mfn1*) y 2 (*Mfn2*), así como del gen de la atrofia óptica 1 (*Opa1*), junto con una activación de la expresión de la proteína mitocondrial rica en ácido glutámico (*Mgarp*, del inglés *Mitochondria-localized Glutamic Acid-Rich Protein*), implicada en la morfología y el tráfico mitocondrial y regulada por hipoxia (Li y cols., 2009), y de la isoforma 2 de Citocromo C Oxidasa 4 (*Cox4l2*), inducida en hipoxia para mejorar la transferencia de electrones en situaciones con bajos niveles de oxígeno (Fukuda y cols., 2007). Por otro lado, tanto a E12.5 como a E14.5 se encontró disminuida la expresión de diversos genes de componentes del poro

de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, del inglés *mitochondrial Permeability Transition Pore*), como la ciclofilina D (*Ppif* o *CypD*), el translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina (*Slc25a4* o *Ant1*) o el transportador mitocondrial de fosfato (*Sl25a23*) (Fig. 29B). Además, a E14.5 los corazones mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaron una disminución en la expresión del transportador de aniones *Ucp3* (del inglés, *Uncoupling Protein 3*) (Fig. 29B), cuya función principal es mantener el mPTP cerrado y disminuir los niveles de ROS (Chen y cols., 2015). Asimismo, estas alteraciones mitocondriales estaban acompañadas de un incremento en los niveles de ROS, detectados mediante tinción con la sonda específica dihidrorodamina (DHR) (Fig. 29C).

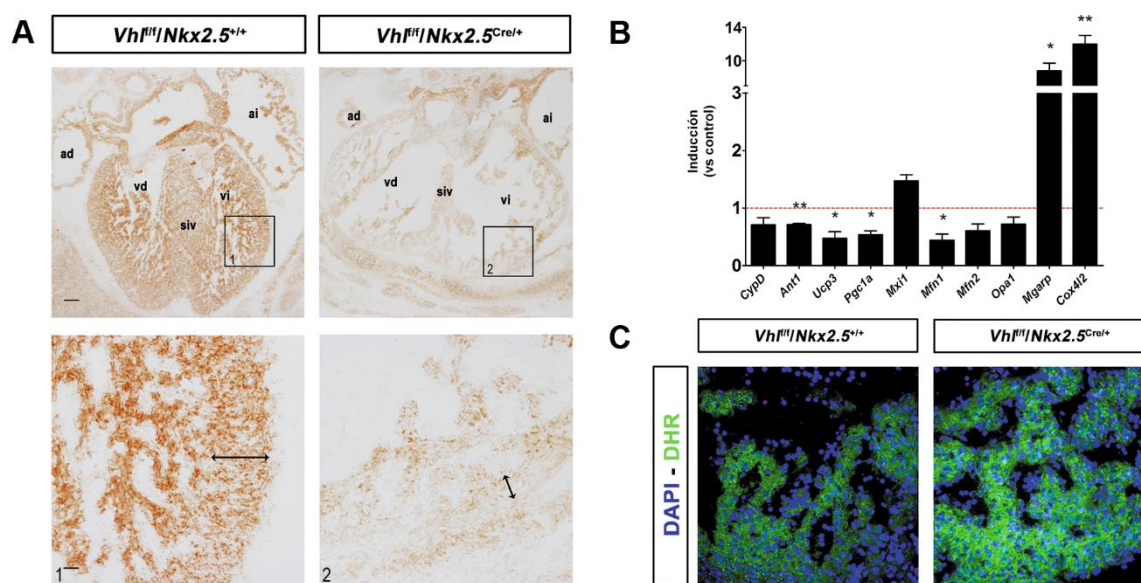


Figura 29 – Alteraciones en la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Secciones representativas de tejido no fijado de embriones control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) a E14.5 teñidos para actividad de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (COX4). Las flechas indican el grosor del miocardio compacto. Las barras de escala representan 100µm (paneles superiores) y 20µm (recuadros del ventrículo izquierdo). **B)** Análisis por qPCR de genes relacionados con biogénesis y dinámica mitocondrial en tejido ventricular de embriones mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student. **C)** Secciones frescas de corazón de embriones control (izquierda) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (derecha) a E14.5 teñidas con dihidrorodamina (DHR, verde) para medir la producción de ROS. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Por último, se determinó la activación de rutas autofágicas y mitofágicas mediante estudios de expresión génica en respuesta al alto número de mitocondrias no funcionales o dañadas. Los resultados mostraron que, si bien la transcripción de componentes de la ruta canónica de autofagia no estaban afectados a E14.5 (Fig. 30A), los mutantes *Vhl/Nkx2.5* mostraron una expresión incrementada de *Bnip3* y *Nix*, mediadores de mitofagia en respuesta a HIF1 en células tumorales (Zhang y cols., 2008). Este incremento, junto con la presencia de mitofagosomas detectados por MET (Fig. 30B), podrían explicar el reducido contenido mitocondrial en estos mutantes.

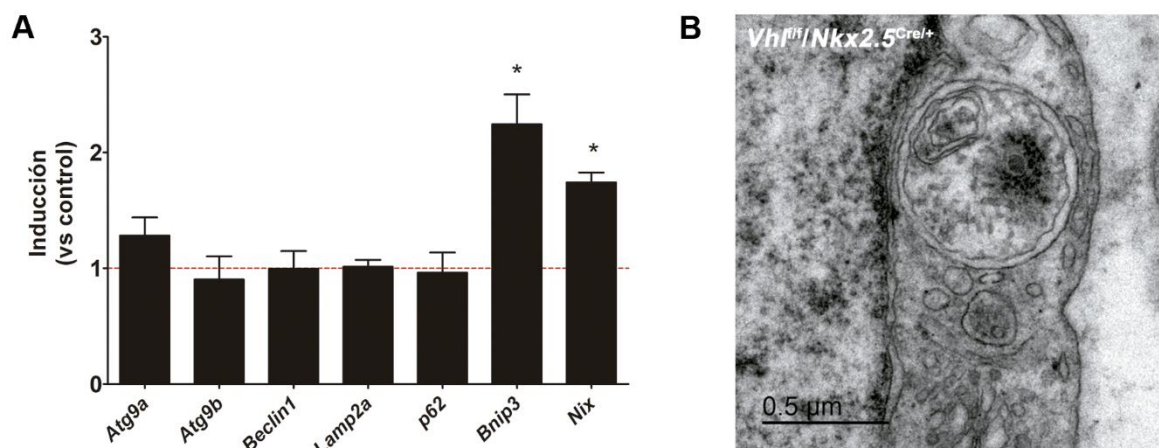


Figura 30 – Procesos de autofagia y mitofagia en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Análisis por qPCR de genes relacionados con autofagia y mitofagia en tejido ventricular de embriones mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles (*Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, test t de Student. **B)** Imagen representativa de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de un mitofagosoma en mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5.

En resumen, estos resultados demuestran que la activación mantenida de la señalización por HIF1α en etapas centrales de la gestación resulta en marcadas alteraciones mitocondriales, tanto a nivel estructural como funcional, así como un incremento en el estrés oxidativo y de los procesos de mitofagia mediados por BNIP3/NIX en el miocardio embrionario.

Con el objetivo de determinar el papel directo de HIF1α en estas alteraciones mitocondriales, se analizó en primer lugar el nivel de expresión de varios genes involucrados en biogénesis y dinámica mitocondrial a E14.5 mediante PCR cuantitativa (Fig. 31A). Los resultados mostraron un aumento significativo de *Pgc1α* en los mutantes *Hif1α/Vhl/Nkx2.5* en comparación con los controles hermanos de camada, sugerente de un incremento en la biogénesis mitocondrial. Este incremento en *Pgc1α* estaba acompañado de incrementos moderados, si bien no significativos, de *Mfn1* y *Opa1*. Por otro lado, los niveles de *Mxi1* no se vieron alterados, sin observarse el incremento que presentaban los mutantes simples de *Vhl* (Fig. 29B). Estos resultados sugieren que la regulación de *Mxi1* en el miocardio embrionario pudiera ser independiente de HIF1.

Para valorar el efecto del aumento en los niveles de *Pgc1α* sobre la biogénesis mitocondrial, se determinó tanto la actividad mitocondrial como el número de mitocondrias a E14.5, mediante análisis por tinción COX4 (Fig. 31B) y MET (Fig. 31C), respectivamente. Tanto la actividad mitocondrial como la cuantificación del número de mitocondrias (Fig. 31D) descartaron la existencia de diferencias a este nivel entre los dobles mutantes y los embriones control a E14.5.

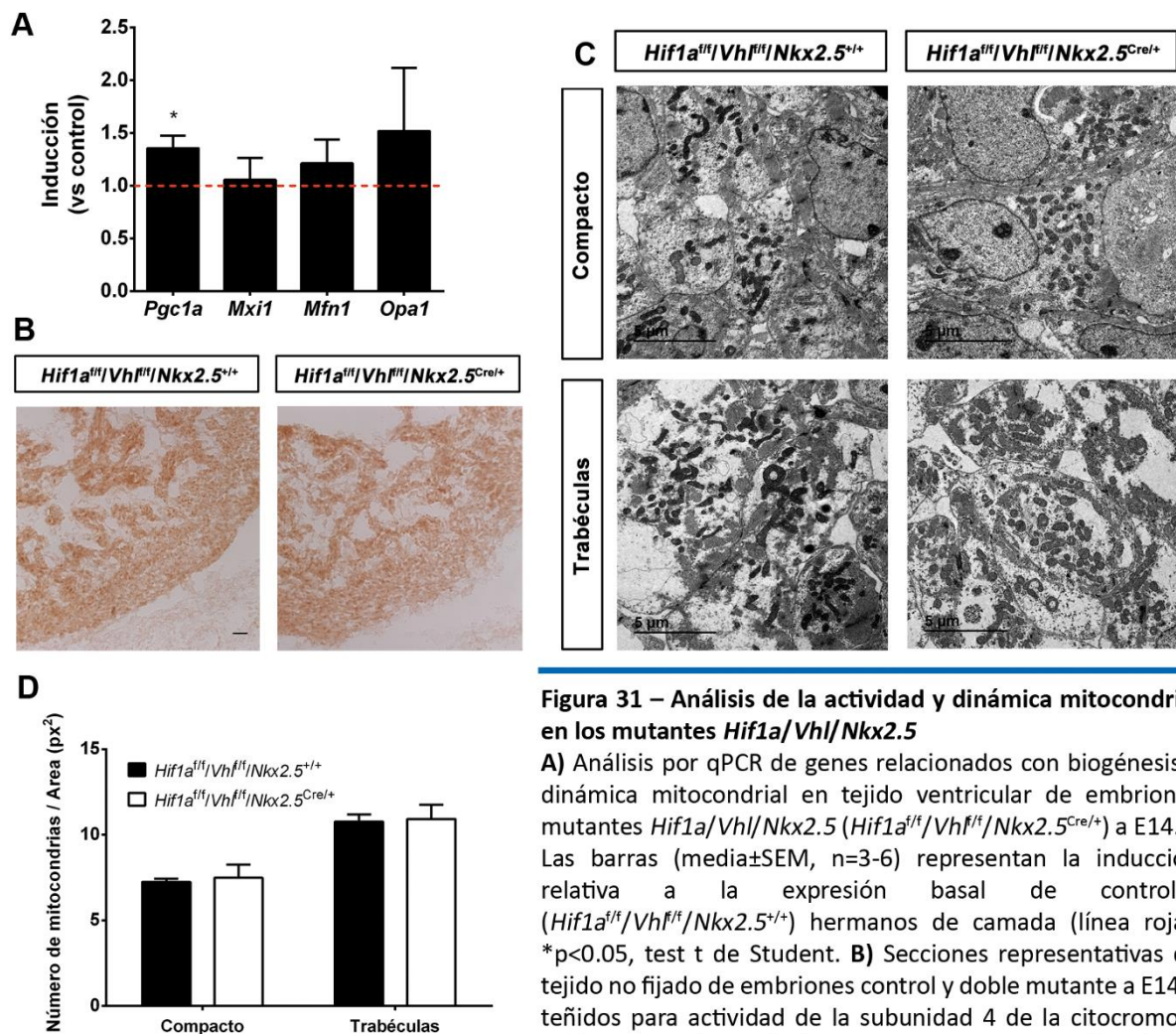


Figura 31 – Análisis de la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*

A) Análisis por qPCR de genes relacionados con biogénesis y dinámica mitocondrial en tejido ventricular de embriones mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (*Hif1a^{f/f}/Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3-6) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles (*Hif1a^{f/f}/Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, test t de Student. **B)** Secciones representativas de tejido no fijado de embriones control y doble mutante a E14.5 teñidos para actividad de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (COX4). Las imágenes representan magnificaciones

del ventrículo izquierdo. La barra de escala representa 20µm. **C)** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control y mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*, tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). **D)** Cuantificación del número de mitocondrias en las imágenes de MET en embriones control (barras negras) y mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (barras blancas). Los resultados se expresan como número de mitocondrias por área de tejido (px²). En todos los casos, se presenta media±SEM (n=4), test t de Student.

En conjunto, estos resultados indican que la pérdida simultánea de *Hif1a* y *Vhl* rescata el fenotipo mitocondrial observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, sin afectar al normal desarrollo de la red mitocondrial cardiaca, y demuestran que la inhibición de la señalización dependiente de HIF1α a E14.5 es necesaria para la correcta homeostasis y función mitocondrial en el miocardio embrionario.

2.5 Efecto de la delección de *Vhl* en la función cardiaca del corazón embrionario

En base a la pérdida de compartimentos metabólicos observada en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* se analizó la función cardiaca de los embriones para determinar el impacto funcional de las alteraciones bioenergéticas causadas por la señalización mantenida de HIF1. El análisis por ecocardiografía de los embriones a E14.5 confirmó, por un lado, las alteraciones estructurales – adelgazamiento del MC y dilatación de las cámaras ventriculares – de los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 32A, paneles superiores). Por

otro lado, el análisis mediante el modo Doppler-color para medir el flujo sanguíneo confirmó los defectos del SIV, al mostrar flujo de sangre entre ambos ventrículos en el 71% de los embriones mutantes analizados (Fig. 32A, paneles centrales). Además, el análisis mediante el modo M, para valorar la contractilidad, reveló que el movimiento de la pared ventricular en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* era muy bajo o nulo (Fig. 32A, paneles inferiores). A la vista de estas alteraciones se cuantificaron la fracción de eyección y la fracción de acortamiento del VI como parámetros de función cardiaca, en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* y en controles hermanos de camada. Los resultados mostraron que tanto la fracción de eyección (Fig. 32B) como la fracción de acortamiento (Fig. 32C) estaban significativamente disminuidas en los corazones deficientes en *Vhl*.

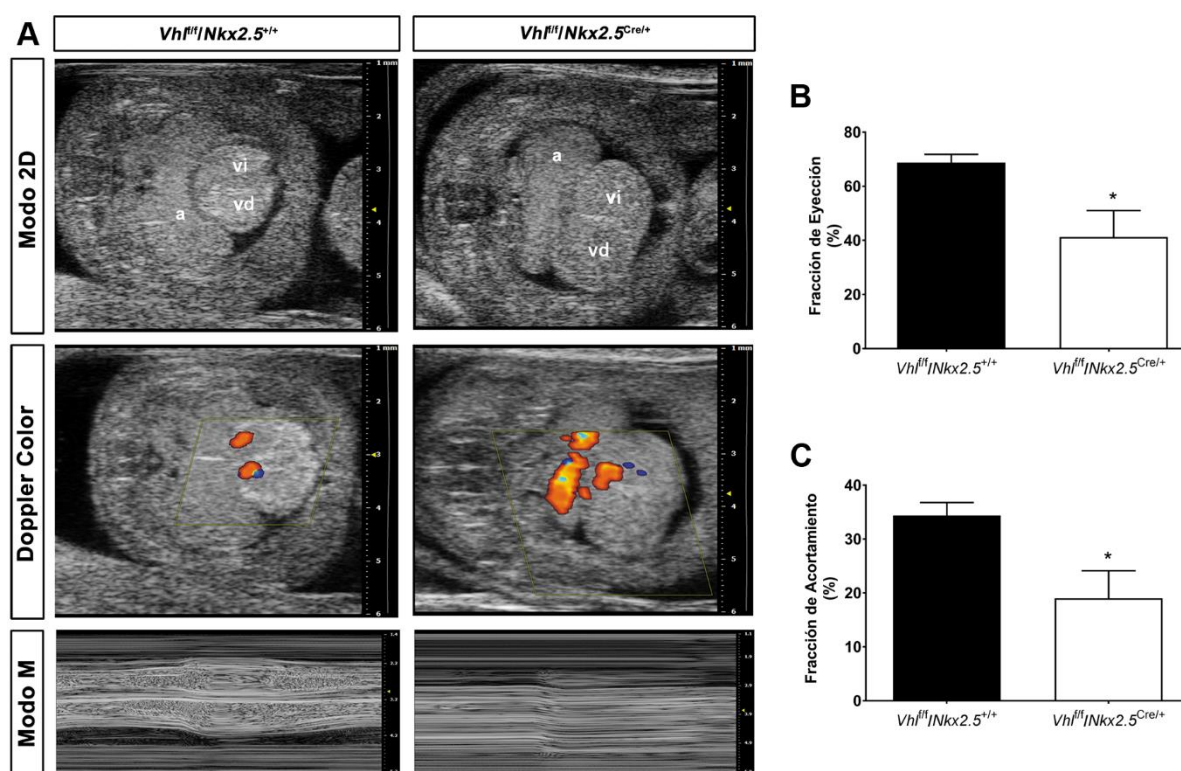


Figura 32 – Análisis de la función cardiaca en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Análisis de la función cardiaca mediante ecocardiografía intrauterina en embriones control (*Vhl^{fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) hermanos de camada a E14.5. Se muestran el modo bidimensional (paneles superiores), el modo Doppler-color (paneles centrales) y el modo monodimensional o M (paneles inferiores). **B)** Cuantificación de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en embriones control (barra negra, n=10) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (barra blanca, n=7) a E14.5. **C)** Cuantificación de la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo en embriones control (barra negra, n=10) y mutante *Vhl/Nkx2.5* (barra blanca, n=7) a E14.5. En todos los casos se presenta media±SEM, *p<0.05, test t de Student. a: aurículas, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo.

Por otro lado, se realizó el mismo análisis en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*. El modo bidimensional (Fig. 33A, paneles superiores) confirmó la ausencia de alteraciones morfológicas y el rescate de las dimensiones estructurales de los mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Además, el análisis mediante Doppler-color (Fig. 33A, paneles centrales) no mostró alteraciones de comunicación entre cámaras ventriculares por defectos del SIV. El modo M (Fig. 33A, paneles inferiores) mostró que el movimiento de la pared ventricular en los dobles mutantes no presentaba alteraciones significativas. Es más, la

cuantificación de la fracción de eyección (Fig. 33B) y de la fracción de acortamiento (Fig. 33C) del VI no mostró diferencias funcionales entre los embriones control y los dobles mutantes, confirmando de nuevo el rescate de los defectos funcionales del mutante de *Vhl* al eliminar simultáneamente *Hif1a*.

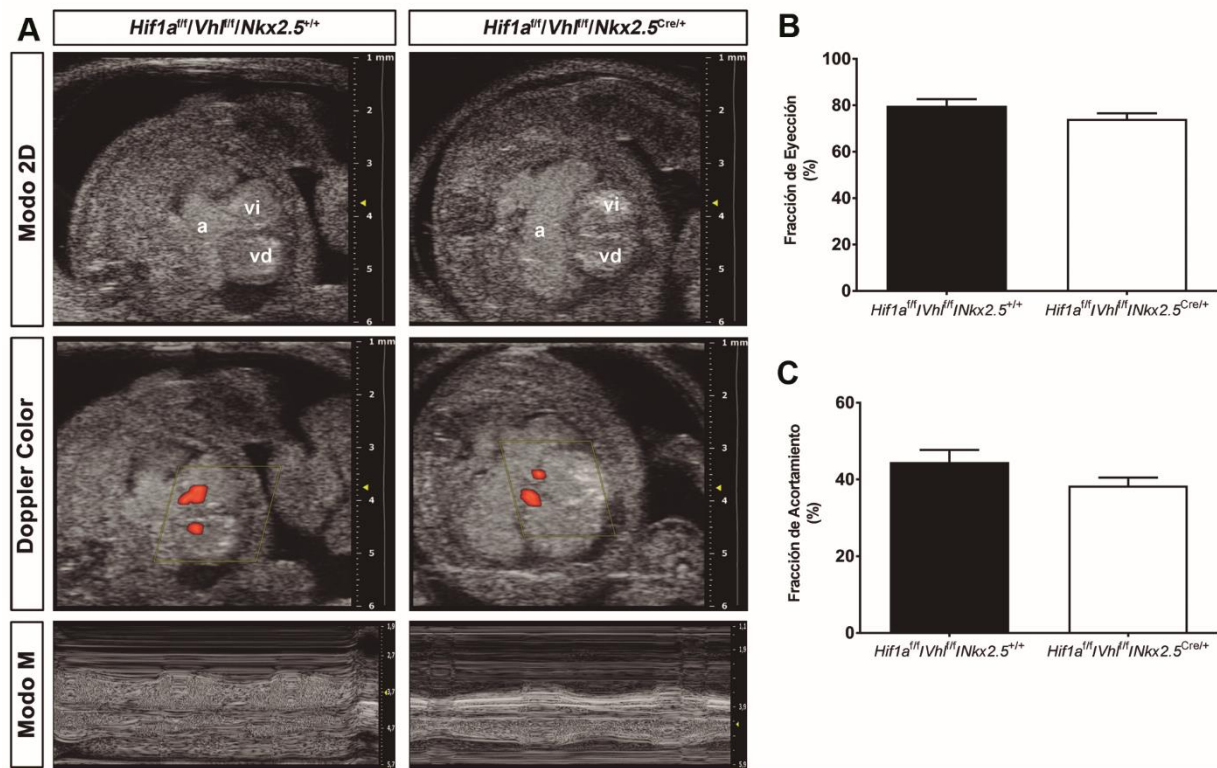


Figura 33 – Análisis de la función cardíaca en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*

A) Análisis de la función cardíaca mediante ecocardiografía intrauterina en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y dobles mutantes (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) hermanos de camada a E14.5. Se muestran el modo bidimensional (paneles superiores), el modo Doppler-color (paneles centrales) y el modo monodimensional o M (paneles inferiores). **B)** Cuantificación de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en embriones control (barra negra, n=9) y doble mutante (barra blanca, n=5) a E14.5. **C)** Cuantificación de la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo en embriones control (barra negra, n=9) y doble mutante (barra blanca, n=5) a E14.5. Las gráficas representan media±SEM, test t de Student. a: aurículas, vi: ventrículo izquierdo, vd: ventrículo derecho.

2.5.1 Alteraciones en el establecimiento del Sistema de Conducción en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

Como se ha descrito previamente, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentan defectos tanto metabólicos como funcionales debidos, en parte, a la extensión de HIF1 a las trabéculas. Por otro lado, pese a que las trabéculas comparten un origen común con el MC, contribuyen especialmente a la formación del Sistema de Conducción (SC) ventricular, principalmente a las fibras de Purkinje (Christoffels y Moorman, 2009; Miquerol y cols., 2011). Esta contribución de las trabéculas, unida al hecho de que el análisis de Ontología Génica del RNASeq mostró alteraciones en un número significativo de genes de conducción/contracción, y que los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentan defectos de contracción según el análisis ecocardiográfico, se analizó la existencia de defectos en el SC de los mutantes *Vhl/Nkx2.5*.

El análisis detallado de la categoría de Sistema de Conducción y contracción del análisis de Ontología Génica del RNASeq a E12.5 reveló alteraciones en la expresión de genes implicados en despolarización de la membrana, regulación del potencial de acción y contracción muscular en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 34A). Curiosamente, muchos de los genes con expresión alterada implicados en estos procesos, en su mayoría canales de calcio, sodio y potasio, están relacionados con procesos patológicos, como el síndrome de Brugada o el síndrome de QT largo (George, 2014). Estos resultados se confirmaron a E14.5 mediante qPCR (Fig. 34B).

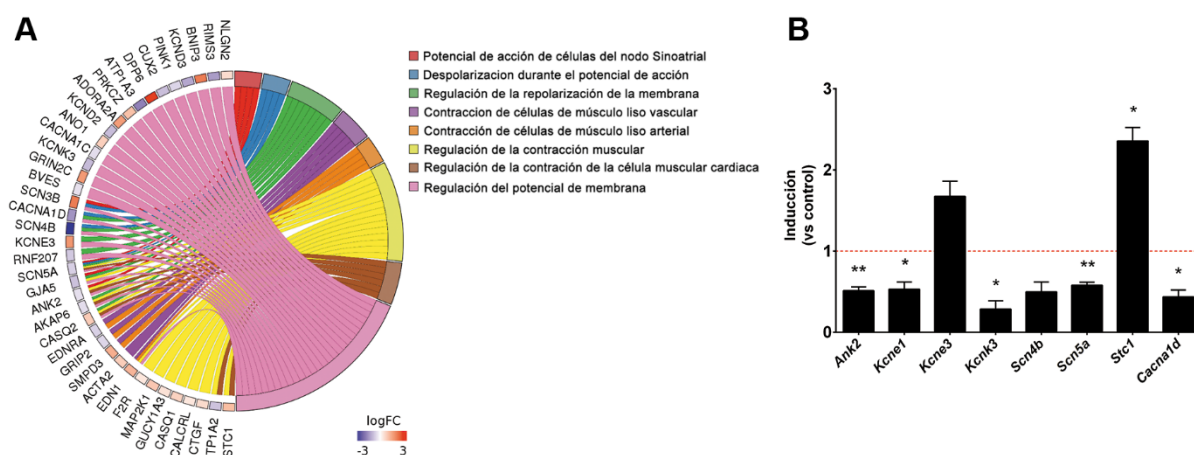


Figura 34 – Alteraciones en la expresión de genes relacionados con conducción y contractilidad en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Genes diferencialmente expresados E12.5 correspondientes a la categoría “Conducción y Contractilidad” con sus términos de Ontología Génica asociados. Los cambios en la expresión se presentan para el mutante *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) relativos al control (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) y están codificados por color según su inducción (logFC). **B)** Análisis por qPCR de genes relacionados con transporte y homeostasis iónica en tejido ventricular de embriones mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student.

Por otro lado, mediante qPCR a E14.5 se detectó una expresión disminuida del gen *Cx40* (Fig. 35A), que codifica para la proteína de uniones gap CX40 (Conexina 40), un marcador específico de trabéculas esencial para la función del SC ventricular (Sankova y cols., 2012). Además, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* mostraron una disminución en la expresión de los genes *Pcp4l1* (Proteína tipo 1 de células de Purkinje 4, del inglés *Purkinje Cell Protein 4-Like 1*) y *Dpp6* (Dipeptidilpeptidasa 6), ambos involucrados en la maduración y regulación de las fibras de Purkinje, junto con una disminución en la expresión de *Nkx2.5* (Fig. 35A), un importante regulador transcripcional de *Cx40* esencial para el establecimiento del SC (Moskowitz y cols., 2007). Paralelamente, se analizó la distribución de la expresión del gen *Cx40* a E14.5 mediante hibridación *in situ*. Los resultados mostraron que, si bien en ambos casos la expresión estaba restringida a las trabéculas, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentaban una clara disminución en la expresión trabecular de este gen en comparación con sus controles hermanos de camada (Fig. 35B, izquierda). Asimismo, la expresión del factor de transcripción *Tbx5* (del inglés, *T-box factor 5*), esencial para la especiación y diferenciación del SC ventricular y para la expresión de *Cx40* (Moskowitz y cols., 2004),

estaba disminuida en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* a E12.5 (Fig. 35B, derecha). Para determinar si la alteración en el programa genético implicado en el establecimiento del SC ventricular estaba asociado a alteraciones en la identidad trabecular, se analizó por hibridación *in situ* la expresión de otro marcador trabecular no implicado en la formación del SC ventricular, *Anf* o Factor Atrial Natriurético (del inglés, *Atrial Natriuretic Factor*). El resultado mostró que no existen diferencias ni en los niveles ni en el dominio de expresión de este gen entre los mutantes *Vhl/Nkx2.5* y los controles hermanos de camada, tanto a E12.5 (Fig. 35C, izquierda) como a E14.5 (Fig. 35C, derecha).

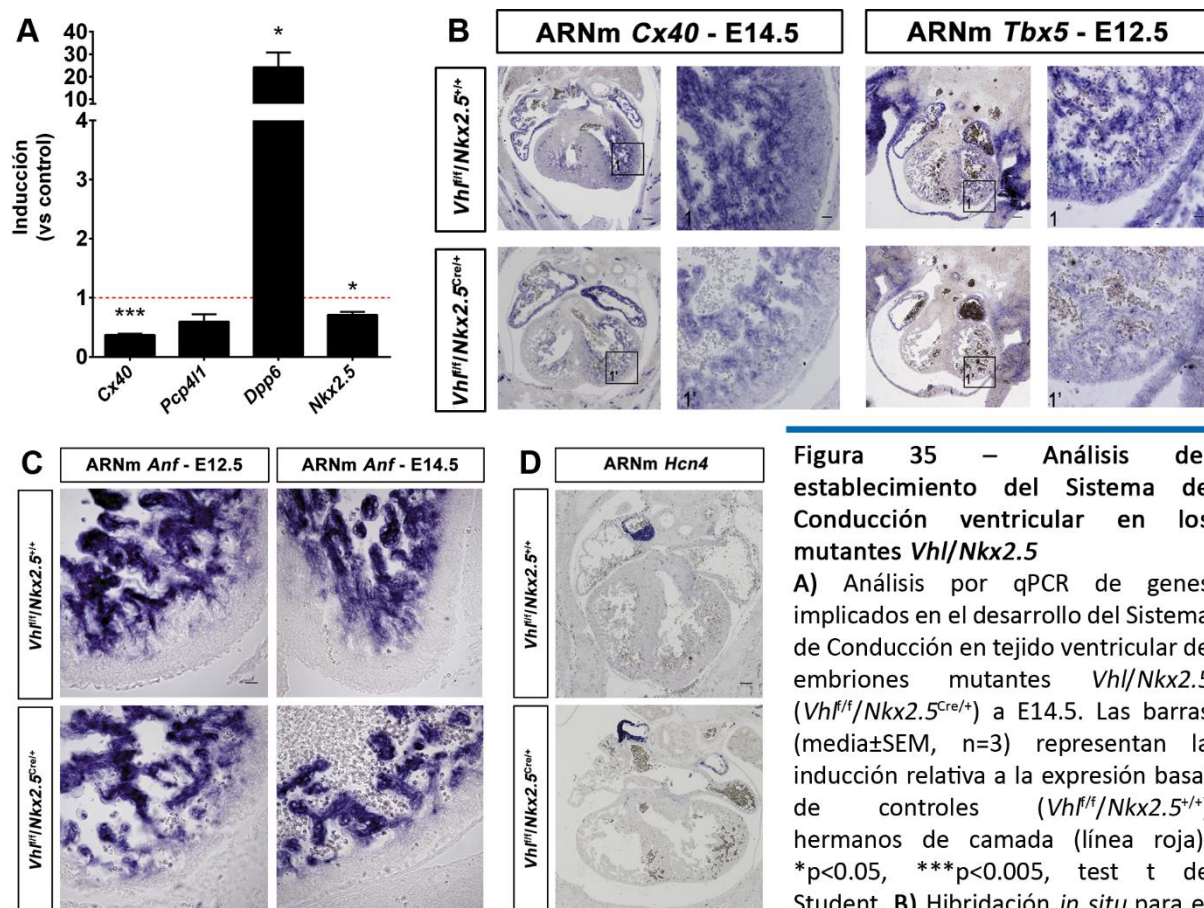


Figura 35 – Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes *Vhl/Nkx2.5*

A) Análisis por qPCR de genes implicados en el desarrollo del Sistema de Conducción en tejido ventricular de embriones mutantes *Vhl/Nkx2.5* (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles (*Vhl^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student. **B)** Hibridación *in situ* para el ARNm de Cx40 a E14.5 (izquierda) y de

Tbx5 a E12.5 (derecha) en embriones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Los recuadros muestran ampliaciones del ventrículo izquierdo. **C)** Hibridación *in situ* para el ARNm de *Anf* a E12.5 (izquierda) y a E14.5 (derecha) en embriones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Los recuadros muestran ampliaciones del ventrículo izquierdo. **D)** Hibridación *in situ* para el ARNm de *Hcn4* a E14.5 en embriones control y mutantes *Vhl/Nkx2.5*. Para todas las imágenes, las barras de escala representan 100µm y 20µm en los recuadros.

Finalmente, se determinó si la afectación en el desarrollo del SC ventricular estaba relacionada con posibles alteraciones en otros componentes del SC no ventriculares, como el nodo sinoatrial, desde el que se inicia el impulso eléctrico dentro del ciclo de contracción cardiaca. Para ello, se determinó mediante hibridación *in situ* la expresión del canal de sodio y potasio *Hcn4*, un marcador de diferenciación de este nodo (Fig. 35D). Los resultados no mostraron diferencias entre genotipos, descartando, por tanto, una afectación a nivel de desarrollo en este nodo en ausencia de *Vhl*.

Para investigar si los cambios en los niveles de expresión de genes del programa genético del SC se debían a la señalización mantenida y extendida de HIF1 α a las trabéculas, se analizaron estos marcadores en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* a E14.5. Por un lado, la expresión de *Tbx5* detectada por hibridación *in situ* mostró una recuperación de la expresión con niveles comparables en el doble mutante y su correspondiente control de camada (Fig. 36A). Asimismo, se observó un rescate parcial de los niveles de *Cx40* en las trabéculas del doble mutante (Fig. 36B). Estos resultados se validaron por PCR cuantitativa, confirmándose un ligero descenso en la expresión de *Nkx2.5*, junto con un rescate de los niveles de *Tbx5* y parcialmente de los de *Cx40* en el doble mutante (Fig. 36C).

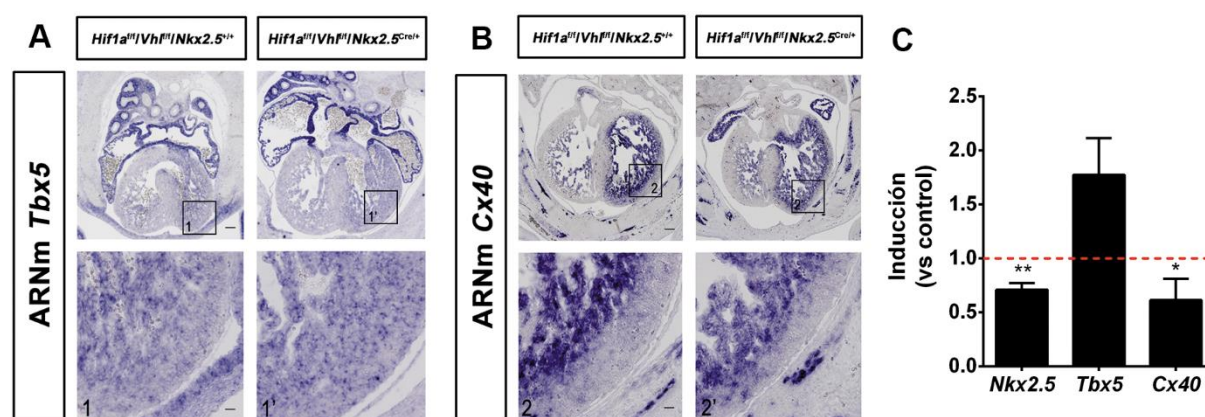


Figura 36 – Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*

A y B) Hibridación *in situ* para el ARNm de *Tbx5* (A) y de *Cx40* (B) a E14.5 en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*). Los recuadros muestran ampliaciones del ventrículo izquierdo. **C)** Análisis por PCR cuantitativa de genes implicados en el desarrollo del Sistema de Conducción en tejido ventricular de embriones dobles mutantes a E14.5. Las barras (media \pm SEM, n=5) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, test t de Student.

En resumen, estos resultados sugieren que la ausencia natural de HIF1 α en el miocardio trabecular es necesaria para una correcta especificación y desarrollo del SC ventricular. La presencia de HIF1 α en las trabéculas promueve el bloqueo del programa genético del SC ventricular, bien por activación de inhibidores de la transcripción, o bien mediante un efecto indirecto del metabolismo asociado a la glucólisis mantenida y a los defectos mitocondriales observados en el mutante *Vhl/Nkx2.5*. Sin embargo, el rescate sólo parcial en el doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* sugiere que *Vhl* podría tener un papel por sí mismo en el desarrollo correcto del SC ventricular.

2.6 Efectos de la doble delección *Hif1a/Vhl* en etapas tardías del desarrollo

Pese a que la doble delección rescata el fenotipo morfológico del mutante simple de *Vhl* a E14.5, los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* siguen presentando letalidad embrionaria sin que se recupere ningún animal doble mutante a nacimiento, frente al 25% esperado (p-valor: 0.004, n=27 animales de un total de 6 camadas). Para identificar las posibles causas de esta letalidad, se realizó un análisis morfológico mediante tinción de hematoxilina-eosina a estadios más avanzados del desarrollo embrionario (Fig.

37A). Los resultados mostraron que, si bien los dobles mutantes no mostraban alteraciones evidentes en las paredes ventriculares y mantenían dimensiones de las mismas similares al control (Fig. 37B,C), sí presentaban defectos del SIV, especialmente en la zona más cercana a la región valvular. Además, se observaron áreas con menor densidad celular, principalmente en el SIV, junto con una retención de sangre tanto a nivel auricular como ventricular, sugere de fallos en la contracción. También se observó hipertrofia de la válvula aórtica, sin alteraciones en el número de membranas que la forman.

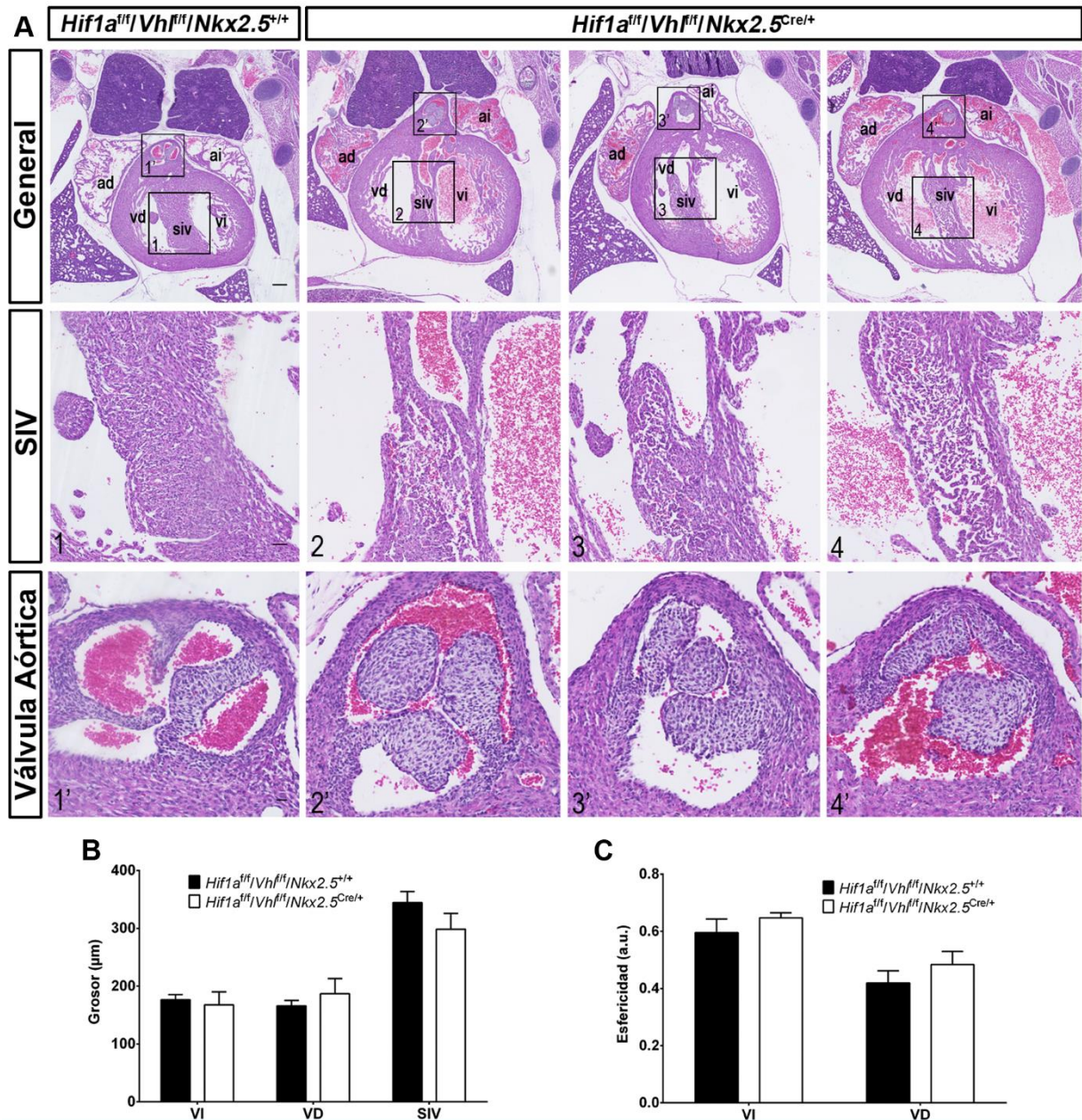
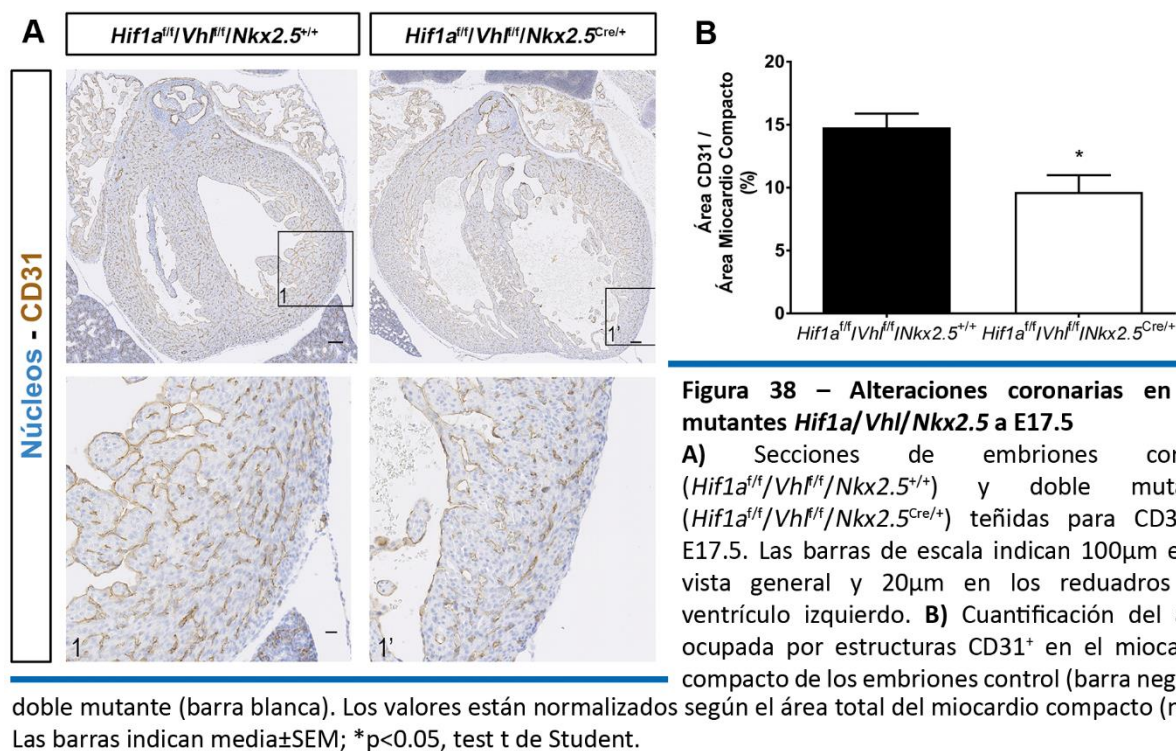


Figura 37 – Análisis histológico de los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* a E17.5

A) Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y dobles mutantes (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E17.5. Las barras de escala representan 200μm (general), 50μm en los recuadros del septo interventricular (1-4) y 20μm en los recuadros de la valvula aórtica (1'-4'). **B,C)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (**B**) y de la esfericidad de los ventrículos (**C**) en embriones control (barras negras) y dobles mutantes (barras blancas). Las barras representan media±SEM (n=5), test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Por otro lado, se caracterizó el desarrollo coronario mediante tinción de CD31 a este estadio, para valorar posibles alteraciones vasculares por la recombinación parcial de la línea *Nkx2.5*Cre en epicardio y endocardio o por la falta de *Hif1a* en el miocardio (Fig. 38A). La cuantificación mostró que el área relativa de estructuras CD31⁺ estaba significativamente disminuida en los dobles mutantes *Hif1a*/*Vhl*/*Nkx2.5* en comparación con los embriones control (Fig. 38B).



Por otro lado, el análisis mediante tinción con aglutinina de germen de trigo (Fig. 39A) no mostró diferencias significativas en el tamaño de los cardiomiocitos entre ambos genotipos (Fig. 39B).

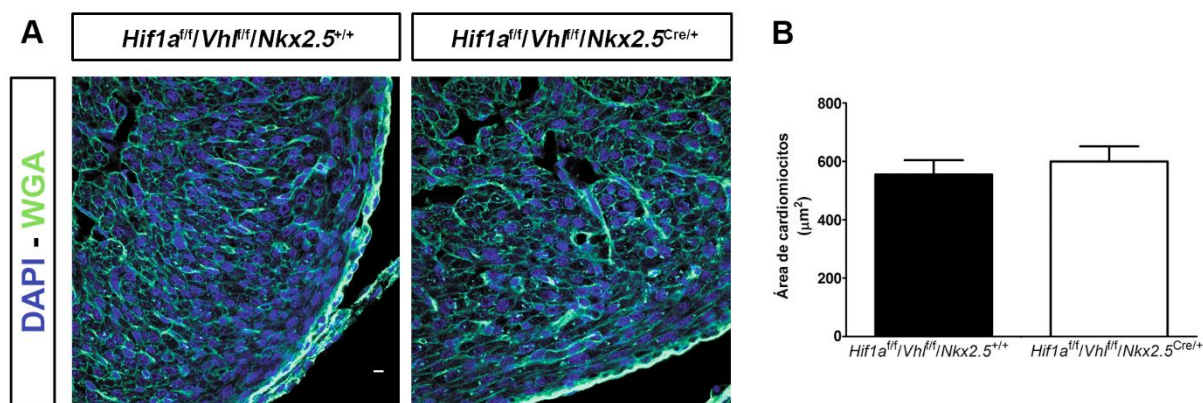


Figura 39 – Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* a E17.5

A) Secciones de corazones a E17.5 de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y doble mutante (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) teñidos con aglutinina de germen de trigo (WGA, en verde) y con DAPI para la detección de núcleos (azul). Las imágenes muestran la pared lateral del ventrículo izquierdo. La barra de escala indica 20µm. **B)** Cuantificación del área transversal de los cardiomiocitos en las tinciones con WGA en embriones control (barra negra) y doble mutante (barra blanca). Las barras representan media±SEM (n=3).

En suma, estos resultados sugieren que, si bien HIF1 α regula el establecimiento de compartimentos metabólicos en el miocardio embrionario, incluyendo en gran medida la homeostasis mitocondrial, así como parte de la especificación del SC ventricular, existen funciones de VHL independientes de la activación de HIF1 α que podrían jugar un papel importante en las etapas tardías del desarrollo embrionario y que resultan esenciales para la viabilidad. Por otro lado, tampoco se puede descartar un papel esencial de HIF1 α en las etapas finales del desarrollo cardíaco.

3 DELECIÓN DE *Hif1a* EN PROGENITORES CARDIACOS NKX2.5

Si bien el modelo de doble delección *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* rescata en gran medida las alteraciones estructurales, metabólicas y funcionales observadas en el mutante simple *Vhl/Nkx2.5*, no permite determinar si efectos como la letalidad embrionaria persistente se deben, bien a la pérdida de *Vhl* en sí misma, asociado a funciones de VHL no relacionadas con la ruta de HIF, o bien a la delección de *Hif1a per se*, por ejemplo, debido a la inhibición del programa glucolítico en el MC.

Para tratar de dar respuesta a estas preguntas y estudiar las consecuencias de la pérdida de *Hif1a* en el corazón embrionario, se generó un modelo de pérdida de función de la ruta. Para ello, se empleó el mismo alelo de *Hif1a* con el exón 2 flanqueado por sitios LoxP (Ryan y cols., 2000) empleado en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*, en combinación con la Cre controlada por el promotor del gen *Nkx2.5* empleada en los modelos animales previamente descritos.

Este modelo de pérdida de función, *Hif1a^{ff}/Nkx2.5^{Cre/+}*, en adelante *Hif1a/Nkx2.5*, presentó recombinación efectiva en tejido cardíaco a E12.5. La delección sólo tuvo lugar en presencia de la Cre recombinasa (Fig. 40A, carril 1 vs carril 3), sin observarse recombinación ectópica en tejidos, como la cola, no pertenecientes al linaje NKX2.5, tanto en presencia como en ausencia de la Cre recombinasa (Fig. 40A, carril 2 y carril 4).

Además, se analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de *Hif1a*, así como de su gen diana *Phd3* (Fig. 40B). Si bien el ARNm de *Hif1a* presentaba niveles más elevados en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* respecto al embrión control, probablemente debido a la alteración de los mecanismos de autorregulación de HIF1 α por ausencia de proteína funcional, la amplificación específica en la región delecionada mostró un descenso significativo de los niveles de expresión, indicativo de una buena eficiencia de recombinación. Además, la expresión disminuida de *Phd3* y *Glut1* confirmaron la delección eficaz de *Hif1a*, al estar disminuida en el mutante. Por otro lado, no se observó un incremento en la expresión de *Hif2a*, sugiriendo la ausencia de mecanismos compensatorios tras la pérdida de *Hif1a*.

Por otro lado, se analizó la distribución de la proteína mediante inmunofluorescencia contra HIF1 α (Fig. 40C). Tanto en las imágenes como en la cuantificación de la intensidad relativa de los núcleos

pertenecientes a cardiomiocitos, se observa un descenso de los niveles de HIF1 α (Fig. 40D). Sin embargo, este descenso no es total y no concuerda con la eficiencia de delección observada por PCR cuantitativa. Una posible explicación a esta discrepancia sería que, si bien el exón 2 delecionado contiene el dominio de unión a ADN, el ARNm resultante tras la delección todavía podría traducirse a una proteína, aunque no funcional. Puesto que los anticuerpos disponibles comercialmente están dirigidos contra el extremo C-terminal de la proteína, no afectado por la delección, se podrían seguir detectando niveles de proteína, si bien no funcional por la incapacidad de unirse al ADN y activar la transcripción de los genes diana de HIF1.

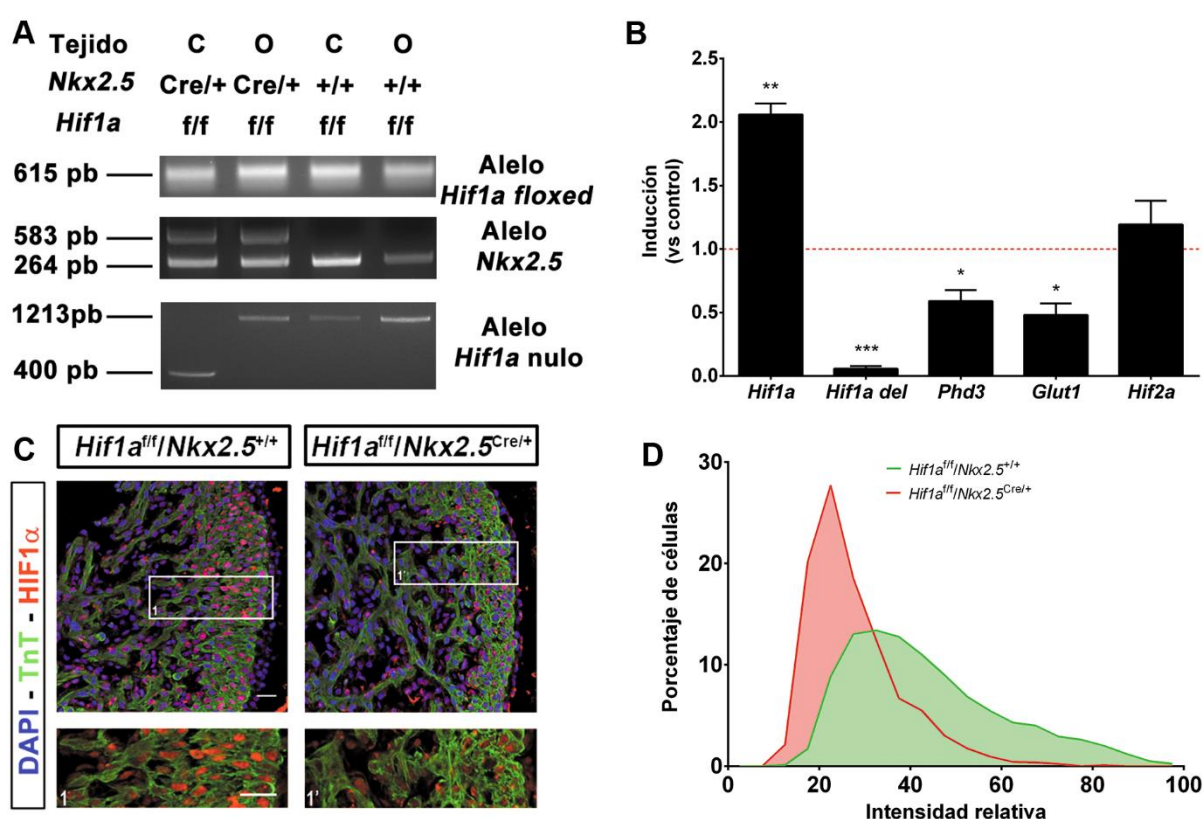


Figura 40 – Delección de *Hif1a* en progenitores cardiovasculares NKX2.5 positivos

A) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de PCR obtenidos para *Hif1a* y *Nkx2.5* sobre ADN genómico de corazón (C) y cola (O) en embriones mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*, carriles 1 y 2) y control (*Hif1a^{fl/f}/Nkx2.5^{+/+}*, carriles 3 y 4) a E12.5. Gel superior: Bandas correspondientes al alelo floxed (615pb) del gen *Hif1a*. Gel intermedio: Bandas correspondientes a los alelos control (264pb) y Cre (583pb) del gen *Nkx2.5*. Gel inferior: Alelo del gen *Hif1a* procesado tras la recombinación mediada por la Cre (400pb) y alelos floxed sin procesar (1213pb). **B)** Cuantificación por PCR cuantitativa de los transcritos de *Hif1a*, incluyendo la región floxeada (*Hif1a* del), *Phd3*, *Glut1* y *Hif2a* en ventrículos deficientes en *Hif1a* a E14.5. Las barras representan la inducción relativa a la expresión basal (línea roja) en los controles hermanos de camada (media \pm SEM, n=3). *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, test t de Student. **C)** Inmunofluorescencia de HIF1 α en embriones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, la troponina T en verde y HIF1 α en rojo. La barra de escala representa 20 μ m. Los recuadros muestran ampliaciones de la pared del ventrículo izquierdo. **D)** Análisis representativo de la intensidad de fluorescencia para el canal de HIF1 α a E12.5 en embriones control (curva verde) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (curva roja).

3.1 Fenotipo de los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

En primer lugar, para determinar si la delección de *Hif1a* en progenitores NKX2.5 afectaba a la viabilidad embrionaria, se realizó un análisis de supervivencia, mediante el recuento del número de mutantes *Hif1a/Nkx2.5* recuperados en el momento del destete. El porcentaje de mutantes recuperados a destete fue de 28.58% (21/94 en 6 camadas independientes) frente al 25% esperado. El p-valor del test de rangos de Wilcoxon fue de 0.787, lo que indica que no existe letalidad embrionaria.

Para descartar posibles alteraciones cardíacas compatibles con la supervivencia de los embriones, se realizó un análisis histológico a E14.5 (Fig. 41A). El resultado mostró que no existen diferencias morfológicas aparentes a este estadio entre los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* y los controles hermanos de camada. La cuantificación tanto de los grosores del MC como del SIV (Fig. 41B), así como de la esfericidad de los ventrículos (Fig. 41C) confirmó la ausencia de alteraciones.

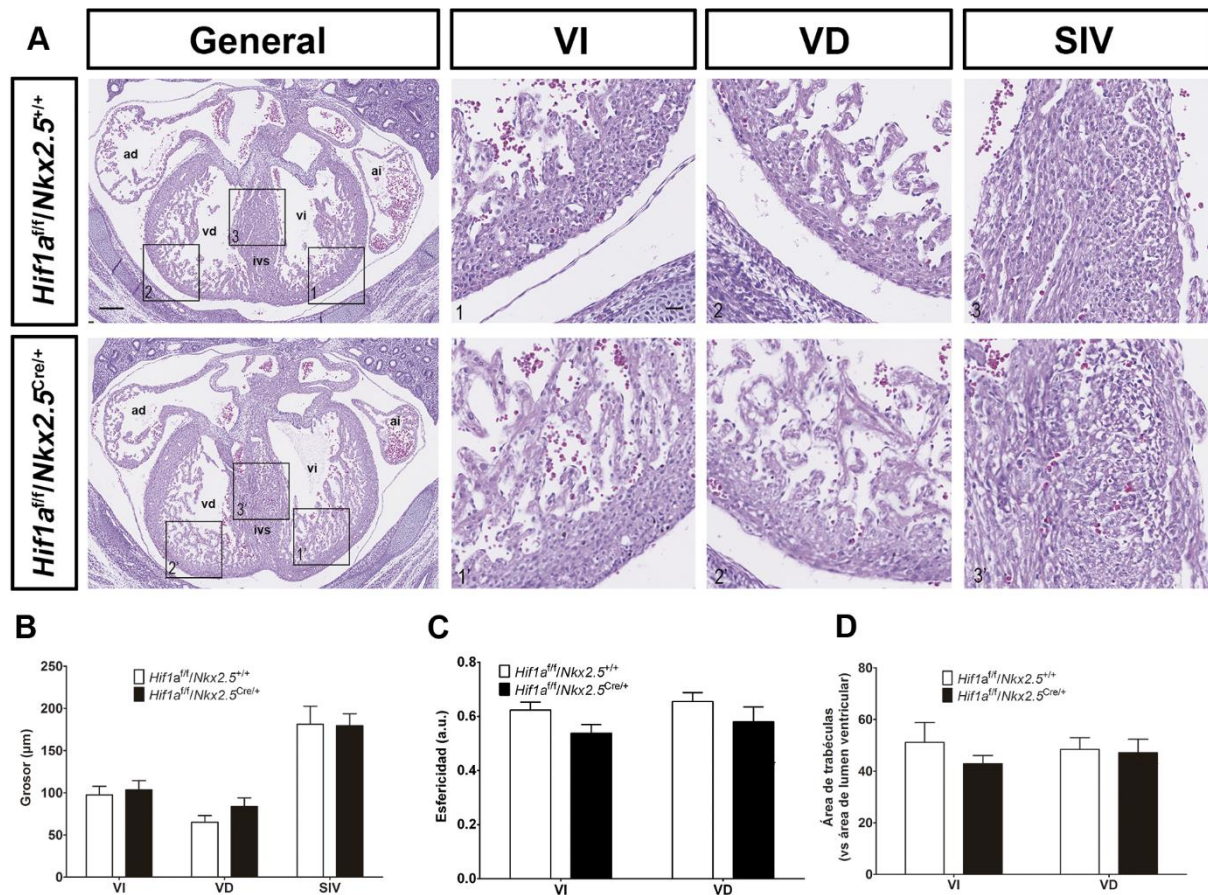


Figura 41 – Análisis histológico de los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E14.5

A) Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de corazones de embriones control (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{+/+}*, arriba) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, abajo) a E14.5. Las barras de escala representan 100 μm (general) y 20 μm (recuadros). **B,C,D)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (B), de la esfericidad de los ventrículos (C) y del área de trabéculas, representada como porcentaje del área del lumen ventricular (D), en embriones control (barras negras) y mutantes (barras blancas). Las barras representan media \pm SEM (n=8), test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Por otro lado, se analizó el tamaño de los cardiomiocitos mediante tinción con aglutinina de germen de trigo (Fig. 42A). La cuantificación mostró que no existen diferencias de tamaño entre los cardiomiocitos deficientes en *Hif1a* y los cardiomiocitos del embrión control (Fig. 42B).

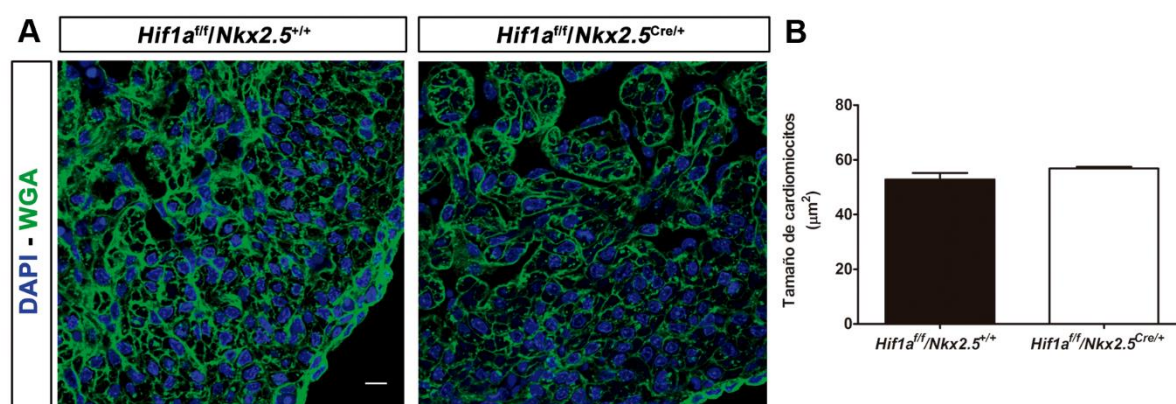


Figura 42 - Tamaño de cardiomiocitos en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E14.5

A) Secciones de corazones a E14.5 de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) teñidos con aglutinina de germen de trigo (WGA, en verde) y con DAPI para la detección de núcleos (azul). Las imágenes muestran la pared lateral del ventrículo izquierdo. La barra de escala indica 20μm. B) Cuantificación del área transversal de los cardiomiocitos en las tinciones con WGA en embriones control (barra negra) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (barra blanca). Las barras representan media±SEM (n=3).

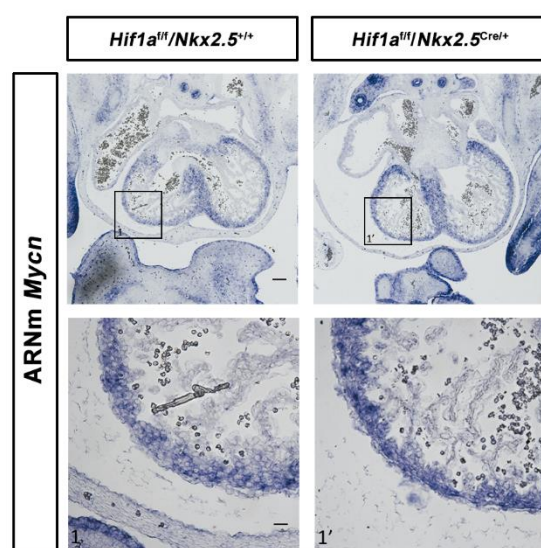


Figura 43 – Análisis de la identidad del miocardio compacto en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Hibridación *in situ* para el ARNm de *Mycn* a E12.5 en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*). Las barras de escala representan 100μm y 20μm en los encuadres del ventrículo derecho.

En base a las observaciones previamente descritas, la desaparición de HIF1α en el MC, donde los niveles de la proteína son altos hasta E12.5 (Fig. 7), podría causar una maduración prematura del MC y la adquisición de un fenotipo trabecular. Para comprobar esta hipótesis se analizó la expresión mediante hibridación *in situ* del marcador de MC *Mycn* (Oncogén MYC Neuroblastoma, del inglés *Neuroblastoma MYC Oncogene*) a E12.5 (Fig. 43). Los resultados mostraron que no existen cambios en los niveles de expresión de este marcador en el MC. Además, en ambos genotipos la expresión estaba restringida al MC, sugiriendo que la identidad del MC es independiente de la señalización de HIF1α esta capa del miocardio en desarrollo tras la pérdida de *Hif1a*.

Estos resultados ponen de manifiesto que la activación de HIF1 en progenitores tempranos del mesodermo cardiaco no es necesaria para el correcto desarrollo del corazón. Sin embargo, no pueden descartarse adaptaciones a distintos niveles que puedan compensar la pérdida de *Hif1a*, evitando la aparición de malformaciones cardíacas.

3.1.1 Análisis del desarrollo de la vasculatura coronaria en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Al igual que en los modelos de delección anteriores, la pérdida de *Hif1a* en el epicardio y en el endocardio, capas a las que también contribuye el linaje NKX2.5, podría causar alteraciones en la vasculatura coronaria que, si bien no resultan en malformaciones embrionarias, podrían predisponer al desarrollo de un fenotipo cardíaco en la etapa adulta. Para analizar esta posibilidad, se determinó, mediante tinción anti-CD31 (Fig. 44A), el número de estructuras vasculares en el MC (Fig. 44B) y el diámetro de la arteria coronaria derecha (Fig. 44C). En ambos casos no se observaron diferencias significativas entre el mutante *Hif1a/Nkx2.5* y el embrión control. Estos resultados indican que la pérdida de *Hif1a* tanto en epicardio como en endocardio no compromete el desarrollo de la red vascular cardíaca.

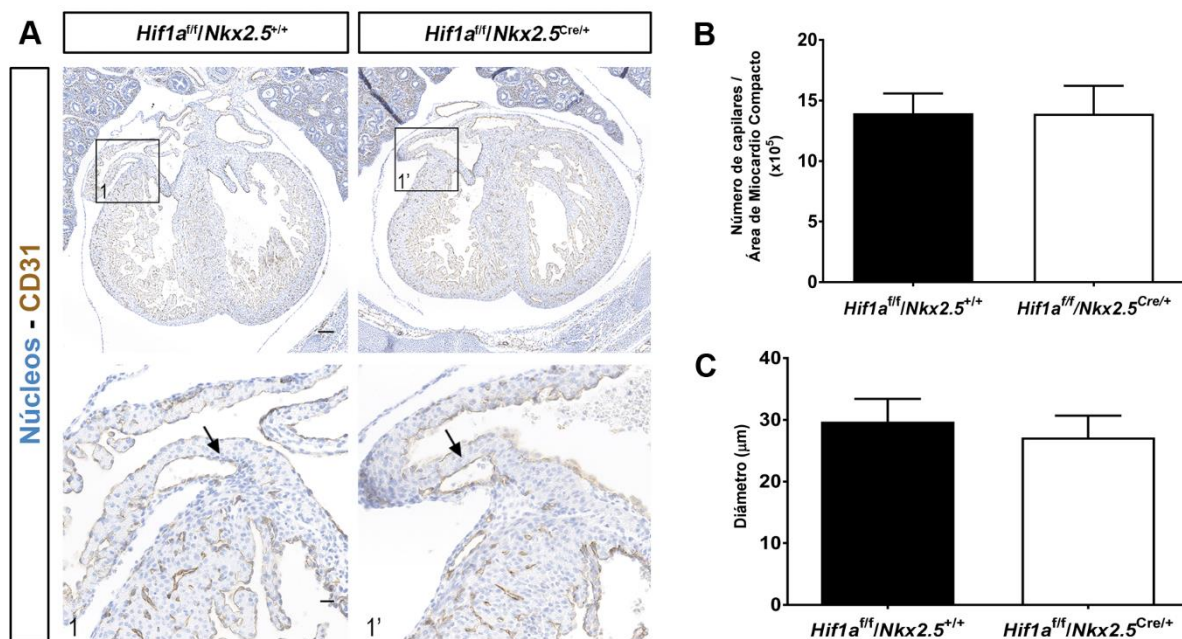


Figura 44 – Alteraciones coronarias en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E14.5

A) Secciones de embriones control (*Hif1a^{fl/f}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutante (*Hif1a^{fl/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) teñidas para CD31 a E14.5. Los recuadros muestran la arteria coronaria derecha (flecha negra). Las barras de escala indican 100μm en la vista general y 20μm en los recuadros. **B)** Cuantificación de las células CD31⁺ en el miocardio compacto de los embriones control (barra negra) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (barra blanca). Los valores están normalizados según el área total del miocardio compacto (n=3 para control, n=4 para mutante). **C)** Cuantificación del diámetro de la arteria coronaria derecha en embriones control (barra negra) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (barra blanca) (n=3 para control, n=4 para mutante). Para todas las gráficas las barras indican media±SEM; test t de Student.

3.1.2 Delección específica de *Hif1a* en cardiomiocitos: *TnTc-Cre*

Al igual que en el modelo de delección de *Vhl*, para excluir posibles contribuciones a nivel de progenitor o en estructuras del linaje NKX2.5 diferentes a los cardiomiocitos, se generó un nuevo modelo de delección de *Hif1a* específica de cardiomiocitos, mediante el empleo de la Cre recombinasa con expresión controlada por el promotor del gen de la Troponina T cardíaca: *Hif1a^{fl/f}/TnTc^{Cre/+}*, en adelante *Hif1a/TnTc*. Por un lado, los niveles de HIF1α determinados mediante inmunofluorescencia en el mutante *Hif1a/TnTc* (Fig. 45A) fueron menores que los observados en el embrión control y comparables

a los observados en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 40C). Además, el análisis histológico a E14.5 (Fig. 45B) no reveló alteraciones morfológicas evidentes, sin presentar diferencias significativas en la cuantificación del grosor del MC y del SIV (Fig. 45C), así como en la esfericidad de los ventrículos (Fig. 45D). Por otro lado, el análisis de letalidad en el momento del destete mostró una recuperación de mutantes *Hif1a/TnTc* del 12.1% (7/58 en un total de 9 camadas), frente al 16.9% esperado. El p-valor resultante del test de rangos de Wilcoxon fue de 0.222, indicativo de ausencia de letalidad embrionaria en este modelo.

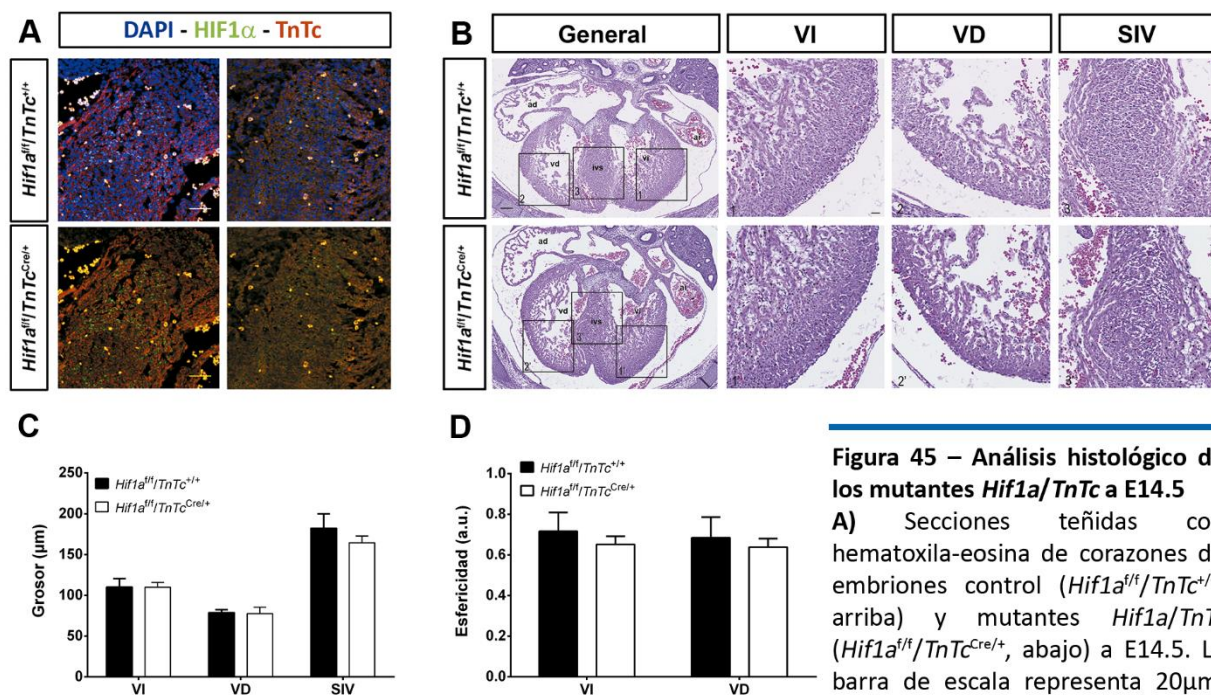


Figura 45 – Análisis histológico de los mutantes *Hif1a/TnTc* a E14.5

A) Secciones teñidas con hematoxila-eosina de corazones de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/TnTc^{+/+}*, arriba) y mutantes *Hif1a/TnTc* (*Hif1a^{fl/fl}/TnTc^{Cre/+}*, abajo) a E14.5. La barra de escala representa 20μm. Las imágenes muestran el septo

interventricular. **B,C)** Cuantificación del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (B) y de la esfericidad de los ventrículos (C) en embriones control (barras negras) y mutantes *Hif1a/TnTc* (barras blancas) a E14.5. Las barras representan media±SEM (n=4 para control, n=8 para mutante), test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

Estos resultados confirman que la delección específica de *Hif1a* en cardiomiocitos no provoca alteraciones morfológicas en el desarrollo cardíaco y permiten descartar la posible afectación a nivel de progenitores en el modelo *Hif1a/Nkx2.5*.

3.2 Análisis de la proliferación en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Debido a las alteraciones observadas en la proliferación del corazón embrionario tras la delección de *Vhl* en el modelo *Vhl/Nkx2.5*, se determinó si la delección de *Hif1a* podría afectar a la proliferación del miocardio en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*.

En primer lugar, se determinó la expresión de *Bmp10* mediante hibridación *in situ* en embriones control y mutante *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5 (Fig.46A). *Bmp10* modula la proliferación del miocardio al reprimir la expresión del inhibidor del ciclo celular *p57* (Chen y cols., 2004). Si bien tanto los niveles normales de

Bmp10 a E12.5 observados como la ausencia de fenotipo a E14.5 sugieren una proliferación normal en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*, se analizó la proliferación del miocardio mediante marcaje y tinción con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (Fig. 46B). Los resultados de la cuantificación muestran que, tanto en el MC como en las trabéculas, el porcentaje de células BrdU positivas no varía entre el control y el mutante deficiente en *Hif1a* (Fig. 46C). Estos resultados sugieren que la pérdida de *Hif1a* no es deletérea para la correcta proliferación del miocardio embrionario.

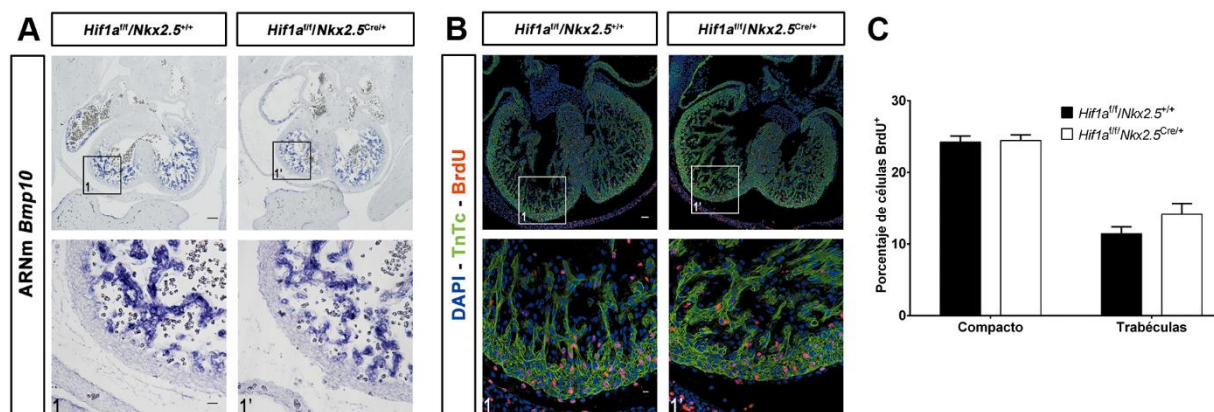


Figura 46 –Análisis de la proliferación en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Hibridación *in situ* para el ARNm de *Bmp10* en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E12.5. Las barras de escala representan 100μm y 20μm en los recuadros del ventrículo derecho. **B)** Inmunofluorescencia contra 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a E12.5 en corazones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, Troponina T en verde y BrdU en rojo. Las barras de escala representan 100μm y 20μm en los recuadros del ventrículo derecho. **C)** Cuantificación del número de células positivas para BrdU en la inmunofluorescencia, representado como porcentaje respecto al total de células en esa capa. Las barras representan media±SEM (n=3), test t de Student.

3.3 Análisis de la formación del Sistema de Conducción en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

La inhibición de la expresión de genes relacionados con el SC observada en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* apunta a un posible papel represor de HIF1 sobre el programa genético de establecimiento del SC cuando está presente en las trabéculas. Por otra parte, el rescate parcial de los niveles de expresión de *Cx40* en el miocardio trabeculado del doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*, sugiere un papel adicional de *Vhl* independiente de HIF1α en este proceso.

Para determinar si existen alteraciones en el establecimiento del SC ventricular en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*, en primer lugar, se determinó la expresión de diversos genes relacionados con este proceso mediante PCR cuantitativa a E14.5 (Fig. 47A). Los resultados no mostraron alteraciones en los niveles de *Cx40*, *Pcp4l1* y *Tbx5*, que en cambio estaban disminuidos en el mutante *Vhl/Nkx2.5*, aunque sí una clara inhibición en la expresión del gen *Dpp6*, cuyo producto se une a canales de potasio, alterando sus propiedades y cuya sobreexpresión se ha relacionado con procesos de fibrilación ventricular (Xiao y cols., 2013). Por otro lado, se analizó la expresión de *Tbx5* a E12.5 (Fig. 47B) y de *Cx40*

a E14.5 (Fig. 47C) en embriones control y el mutante *Hif1a/Nkx2.5* mediante hibridación *in situ*, sin detectarse alteraciones ni en los niveles ni en la región de expresión de los mismos.

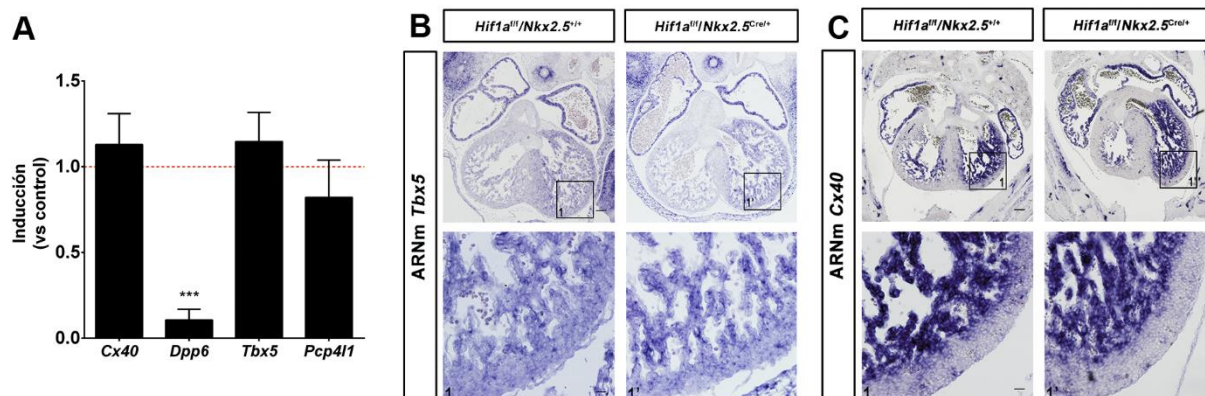


Figura 47 – Análisis del establecimiento del Sistema de Conducción ventricular en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Análisis por qPCR de genes implicados en el desarrollo del sistema de Conducción en tejido ventricular de embriones mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E14.5. Las barras (media±SEM, n=5) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) hermanos de camada (línea roja). ***0.005<p, test t de Student. B) Hibridación *in situ* para el ARNm de *Tbx5* a E12.5 en embriones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. C) Hibridación *in situ* para el ARNm de *Cx40* a E14.5 en embriones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Para todas las imágenes, las barras de escala representan 100µm y 20µm en los recuadros del ventrículo izquierdo.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que HIF1 jugaría un papel inhibitorio sobre el establecimiento del SC ventricular sólo cuándo se expresa en el miocardio trabeculado, sin tener un efecto negativo al estar presente en el MC.

3.4 Análisis de la expresión génica en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Muestra	Genotipo	Somitos	RIN
1	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	9.7
2	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	10
3	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	9.9
4	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	9.9
5	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}</i>	27	9.6
6	<i>Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}</i>	27	10

Tabla 11 – Muestras empleadas en el análisis de RNASeq

Para cada muestra se muestra el genotipo del embrión (control *Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}* o mutante *Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, primera columna), el número de somitos (segunda columna) y el valor RIN (tercera columna), indicativo de la calidad del ARN obtenido, en una escala de 1 a 10.

Para tratar de determinar posibles mecanismos adaptativos que permitan una cardiogénesis normal en ausencia de señalización mediada por HIF1, se realizó un análisis de expresión mediante RNASeq en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* y controles hermanos de camada a E12.5. El procedimiento de recolección y procesamiento de las muestras fue idéntico al descrito para los mutantes *Vhl/Nkx2.5*, (Sección 2.1.3 de Materiales y Métodos), seleccionándose también en este

caso parejas control-mutante de la misma camada con un número similar de somitos (Tabla 11).

El análisis bioinformático identificó 14406 genes codificantes de proteína expresados, de los cuales 198 mostraron expresión diferencial, considerando una diferencia significativa de expresión aquellos con un $p\text{-valor} < 0.05$, ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg. De estos 198 diferencialmente expresados, 81 presentaron mayor expresión en el mutante deficiente en *Hif1a*, mientras que los 117 restantes presentaron expresión reducida.

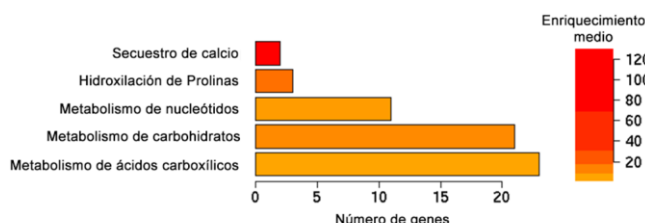


Figura 48 – Análisis de términos de Ontología Génica en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica mediante GOrilla contra la base de datos de Procesos Biológicos. La longitud de las barras es proporcional al número de genes asociados a cada una de las categorías definidas *ad hoc* a partir de los términos enriquecidos ($p < 0.001$) identificados por GOrilla. El color de las barras representa el enriquecimiento relativo medio en el control (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) respecto al mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*)

Con el objetivo de determinar posibles procesos alterados en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*, se llevó a cabo un análisis de GO contra la base de datos de procesos biológicos de GOrilla. Los resultados mostraron alteraciones significativas en procesos correspondientes a las categorías “Metabolismo de hidratos de carbono”, “Metabolismo de nucleótidos y nucleósidos”, “Metabolismo de ácidos carboxílicos”, “Secuestro de calcio” e “Hidroxilación de prolina” (Fig. 48).

3.5 Análisis metabólico de los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

3.5.1 Análisis del metabolismo de la glucosa en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Uno de los procesos biológicos con mayor número de genes con expresión alterada mediante el análisis por Ontología Génica, fueron los relacionados con procesos metabólicos de los hidratos de carbono. En especial, los procesos relacionados con la ruta glucolítica presentaron una fuerte inhibición (Fig. 49).

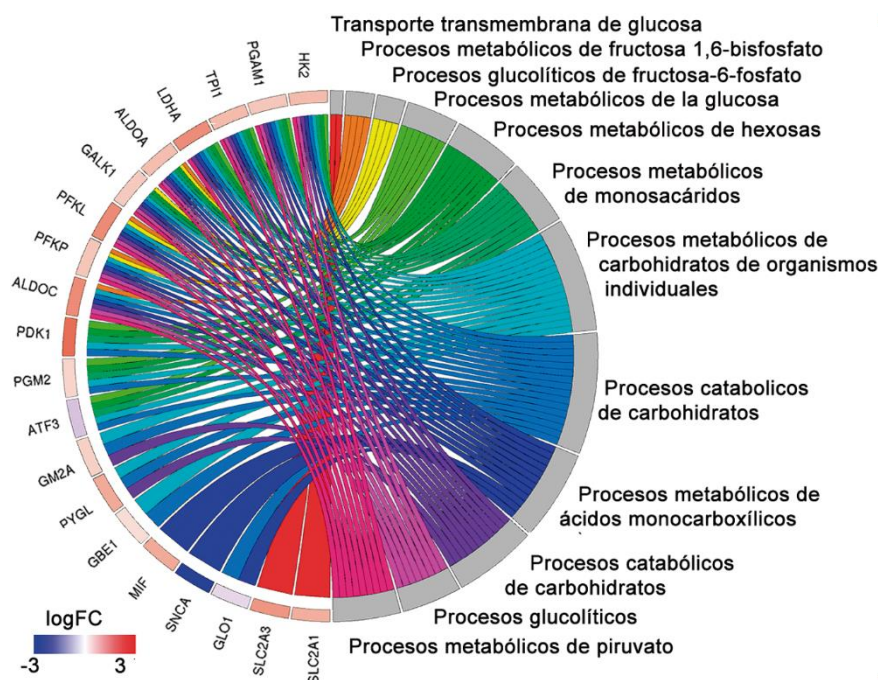


Figura 49 – Alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría “Metabolismo de carbohidratos” con sus términos de Ontología Génica asociados. Se muestran términos con $FDR < 0.05$ (Tasa de Falsos Positivos, del inglés *False Discovery Rate*). Los cambios en la expresión se presentan como inducción (logFC), codificada por color, en los embriones control (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) respecto al mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*).

Con el objetivo de confirmar si la delección de *Hif1a* por sí misma es la responsable de la inhibición transcripcional de los genes glucolíticos observada en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (Fig. 25), se analizó la expresión de los ARNm de *Glut1*, *Pdk1* y *Ldha* a E12.5 y E14.5 mediante hibridación *in situ* en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Los resultados mostraron que, tanto a E12.5 (Fig. 50A, izquierda) como a E14.5 (Fig. 50A, derecha), la expresión de estos genes se encontraba fuertemente inhibida en el MC de los embriones mutantes, manteniéndose la expresión en las trabéculas en los niveles mínimos observados en el control.

Por otro lado, los niveles de GLUT1, analizados mediante inmunofluorescencia se encontraban disminuidos dramáticamente en el MC de los embriones mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5 (Fig. 50B), sin observarse alteración en los bajos niveles presentes en las trabéculas de los embriones control. La cuantificación mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de genes relacionados con la glucolisis también mostró la misma inhibición (Fig. 50C), incluyendo el transportador de ácidos monocarboxílicos *Slc16a3* o *Mct4*, regulado por HIF1 α y responsable del transporte de ácidos monocarboxílicos, entre ellos lactato, a través de la membrana mitocondrial.

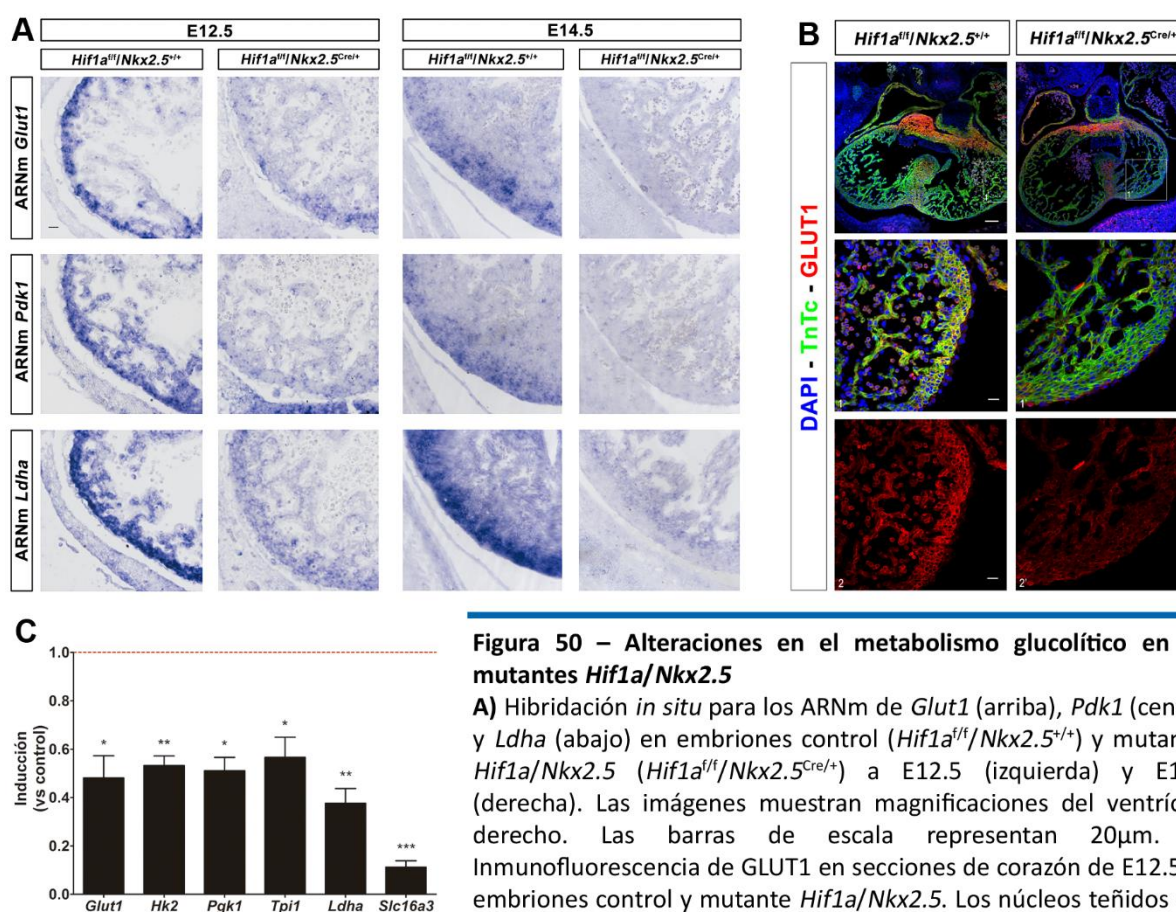


Figura 50 – Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Hibridación *in situ* para los ARNm de *Glut1* (arriba), *Pdk1* (centro) y *Ldha* (abajo) en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha). Las imágenes muestran magnificaciones del ventrículo derecho. Las barras de escala representan 20 μ m. **B)** Inmunofluorescencia de GLUT1 en secciones de corazón de E12.5 de embriones control y mutante *Hif1a/Nkx2.5*. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo.

Las barras de escala representan 100 μ m y 20 μ m en los recuadros del ventrículo izquierdo. **C)** Análisis de expresión por qPCR de genes glucolíticos a E14.5. Las barras (media \pm SEM, n=3) representan la inducción en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* en relación a la expresión en controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, t de Student.

Estos resultados confirman que la delección de *Hif1a* es la responsable de la inhibición glucolítica observada en el MC del doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*. Es más, este resultado plantea que esta dramática, aunque no total, inhibición de la glucolisis no es la responsable de la letalidad embrionaria de los dobles mutantes, al ser el mutante simple *Hif1a/Nkx2.5* viable. Por otro lado, un análisis similar, tanto por hibridación *in situ* de *Glut1*, *Pdk1* y *Ldha* (Fig. 51A) como por inmunohistoquímica contra GLUT1 (Fig. 51B), en los mutantes *Hif1a/TnTc* mostró el mismo resultado, confirmando que el efecto inhibitorio de la delección de *Hif1a* sobre la glucolisis es autónomo a nivel de cardiomiocito y no debido a efectos asociados a la recombinación parcial en el endocardio o el epicardio.

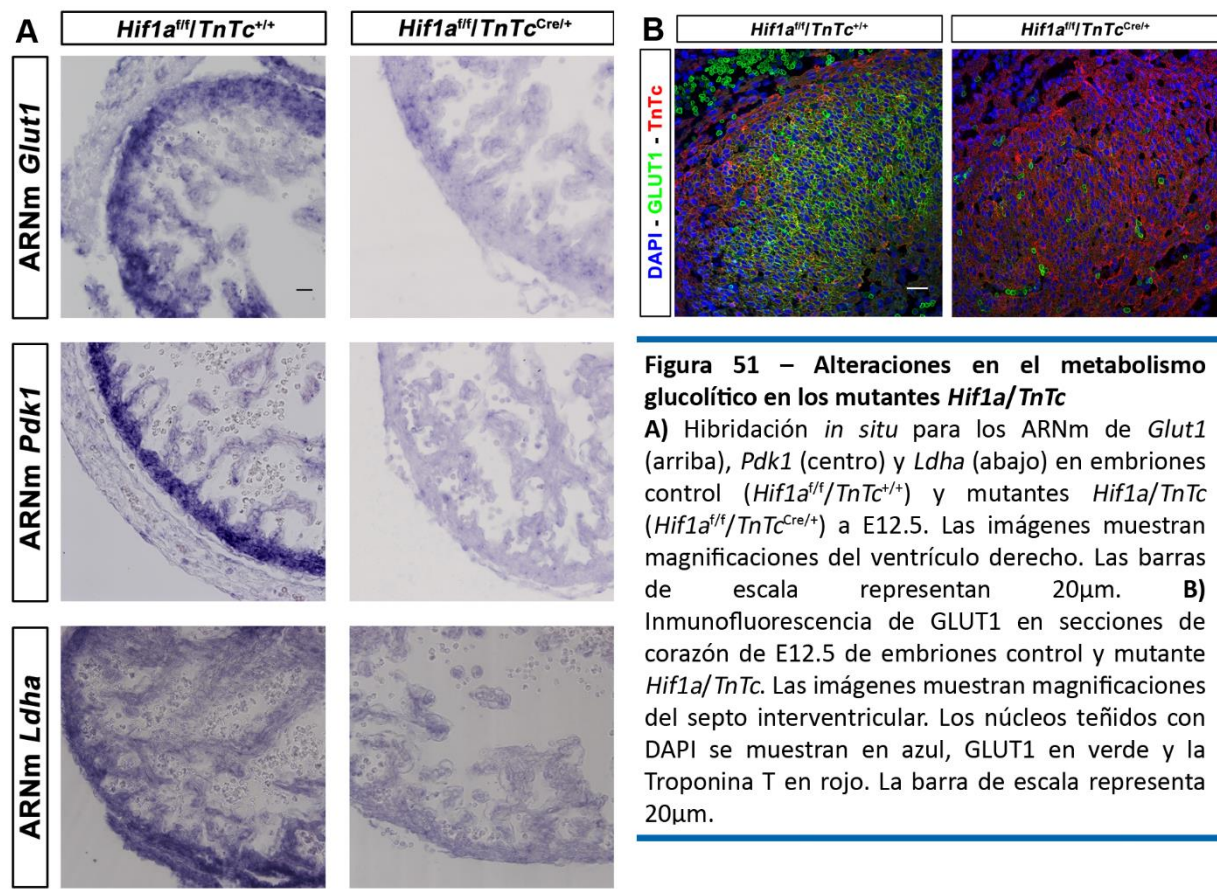


Figura 51 – Alteraciones en el metabolismo glucolítico en los mutantes *Hif1a/TnTc*

A) Hibridación *in situ* para los ARNm de *Glut1* (arriba), *Pdk1* (centro) y *Ldha* (abajo) en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/TnTc^{+/+}*) y mutantes *Hif1a/TnTc* (*Hif1a^{fl/fl}/TnTc^{Cre/+}*) a E12.5. Las imágenes muestran magnificaciones del ventrículo derecho. Las barras de escala representan 20μm. **B)** Inmunofluorescencia de GLUT1 en secciones de corazón de E12.5 de embriones control y mutante *Hif1a/TnTc*. Las imágenes muestran magnificaciones del septo interventricular. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, GLUT1 en verde y la Troponina T en rojo. La barra de escala representa 20μm.

3.5.2 Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Los resultados obtenidos en el modelo simple *Vhl/Nkx2.5* muestran que la señalización mantenida de HIF1α y su expansión a las trabéculas impiden el cambio metabólico hacia la oxidación de ácidos grasos, provocando su acumulación en forma de gotas lipídicas intracelulares. (Fig. 26). Además, en los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* hay un rescate de estas alteraciones, tanto a nivel transcripcional como a nivel de acumulación de gotas lipídicas (Fig. 27), planteando el papel directo de la señalización de HIF1α en esta regulación metabólica.

Por otra parte, el análisis de Ontología Génica no mostró alteraciones en procesos relativos al catabolismo de ácidos grasos a E12.5. Por otro lado, el análisis de expresión por PRC cuantitativa a E14.5

de genes relacionados con esta ruta no mostró la inhibición existente en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 52A), salvo en el caso de la *Acsc1* (sintetasa de acil-CoA de cadena corta, del inglés *Acyl-CoA Synthetase Short-Chain 1*), que codifica un enzima capaz de sintetizar Acetil-CoA a partir de acetato. Sí se detectaron, sin embargo, aumentos en la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo lipídico, como en el caso de la *Crat* (Carnitina acetiltransferasa), que regula el ratio Acil-CoA/CoA, o de la *Lpl* (LipoProteínLipasa), lipasa encargada de la hidrólisis de los triglicéridos presentes en lipoproteínas circulantes.

Por otro lado, se analizó la presencia de gotas lipídicas a E14.5 mediante MET (Fig. 52B). La cuantificación mostró que no existe acumulación de las mismas en el citoplasma de los cardiomiocitos deficientes en *Hif1a*, mostrando niveles similares a los observados en los embriones control en ambas capas del miocardio (Fig. 52C).

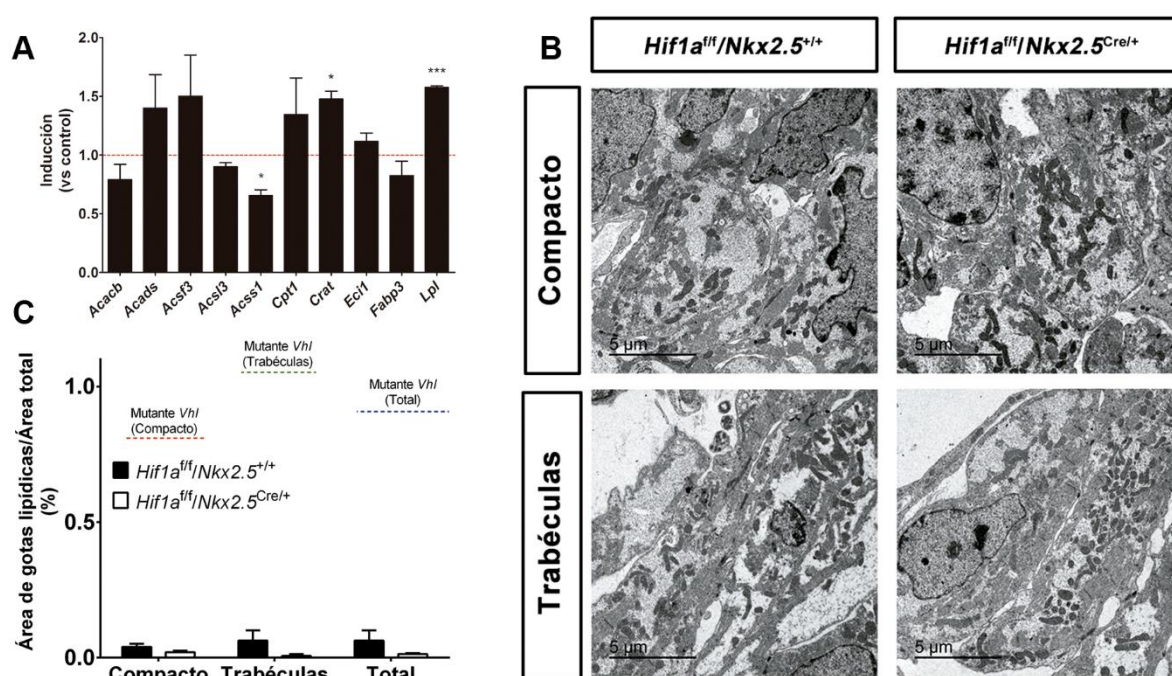


Figura 52 – Alteraciones en el metabolismo lipídico en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Análisis de expresión por PCR cuantitativa de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos a E14.5 en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*). Las barras (media±SEM, n=3-5) representan la inducción en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, línea roja). *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student. **B)** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (izquierda) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (derecha), tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). **C)** Porcentaje del área ocupada por gotas lipídicas en relación al área de tejido (media±SEM, n=3) en las fotografías obtenidas mediante MET en embriones de E14.5 control (barras negras) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (barras blancas). Test t de Student. Las líneas punteadas indican el valor correspondiente al mutante *Vhl/Nkx2.5* en la capa compacta (rojo), en las trabéculas (verde) y en total (azul).

En conjunto, estos resultados apuntan a un incremento del catabolismo de ácidos grasos a E14.5 en ausencia de *Hif1a*. Además, sugieren un papel inhibitor de HIF1α sobre el cambio metabólico embrionario hacia la oxidación de ácidos grasos, además de confirmar que el rescate observado en el doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* en cuanto al metabolismo lipídico se debe a la delección de *Hif1a*.

3.5.3 Alteraciones mitocondriales en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Otro aspecto interesante del doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* es la recuperación, tras la delección simultánea de *Hif1a* y *Vhl*, del número y actividad mitocondrial a niveles comparables a los hallados en los embriones control (Fig. 31), planteando un papel de HIF1 α en el control de la red mitocondrial en el miocardio embrionario. Para confirmar esta hipótesis, se analizó en primer lugar la red mitocondrial mediante inmunofluorescencia contra la proteína estructural TOM20 a E14.5 en embriones control y en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 53A). Los resultados no mostraron diferencias ni en la distribución ni en la intensidad de la tinción entre ambos genotipos. Con el objetivo de obtener una medida más precisa del contenido mitocondrial, se determinó el número de mitocondrias mediante MET a E14.5 (Fig. 53B). La cuantificación del número de mitocondrias confirmó que, al igual que lo observado en el doble mutante, la delección de *Hif1a* no afecta ni a la cantidad ni a la distribución de mitocondrias entre el MC y las trabéculas a E14.5 (Fig. 53C).

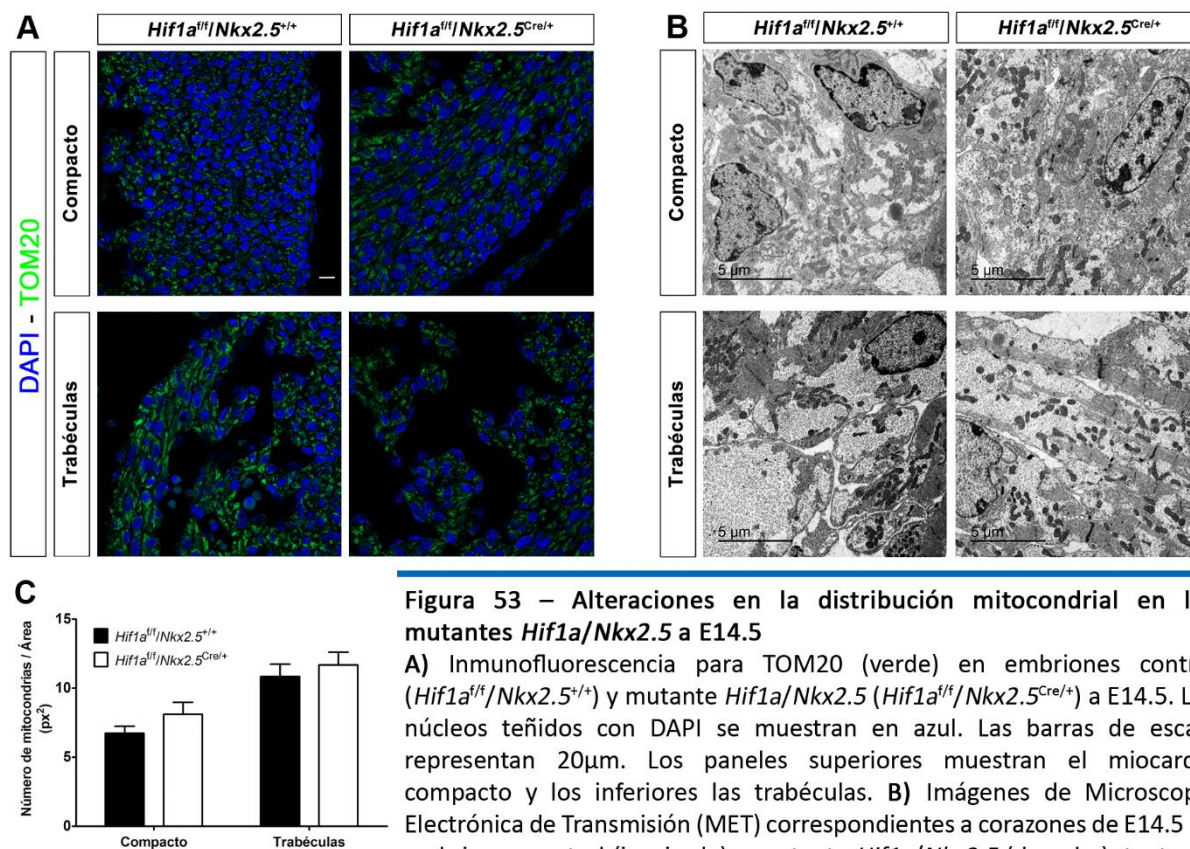


Figura 53 – Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E14.5

A) Inmunofluorescencia para TOM20 (verde) en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a E14.5. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul. Las barras de escala representan 20 μ m. Los paneles superiores muestran el miocardio compacto y los inferiores las trabéculas. **B)** Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) correspondientes a corazones de E14.5 de embriones control (izquierda) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (derecha), tanto en el miocardio compacto (arriba) como en las trabéculas (abajo). **C)** Cuantificación del número de mitocondrias en las imágenes de MET en embriones control (barras negras) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (barras blancas). Los resultados se expresan como número de mitocondrias por área de tejido (px²). En todos los casos, se presenta media \pm SEM (n=3), test t de Student.

También se confirmó, mediante tinción de actividad COX4, la funcionalidad de las mitocondrias en el mutante deficiente en *Hif1a*, ya que no se observaron diferencias de actividad entre éste y el embrión control (Fig. 54A). Además, se observó que la compartimentalización entre MC y trabéculas presente en

los controles estaba conservada en los mutantes. Asimismo, el análisis por PCR cuantitativa a E14.5 de genes relacionados con la homeostasis y remodelado mitocondrial (Fig. 54B) mostró que los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* presentaban expresión significativamente incrementada del componente del mPTP *Ant1*, observándose la misma tendencia en la expresión de *CypD*. También se observó un incremento en la expresión de *Pgc1a*, junto con un descenso en la expresión de *Mxi1*. Por otra parte, la expresión de los genes relacionados con la fusión mitocondrial *Mfn1*, *Mfn2* y *Opa1* estaba incrementada. También se encontró inhibida la expresión de las dianas de *Hif1a* *Mgarp* y *Cox4l2*, además de *Ucp3*, todos ellos relacionados con la distribución y eficiencia mitocondrial.

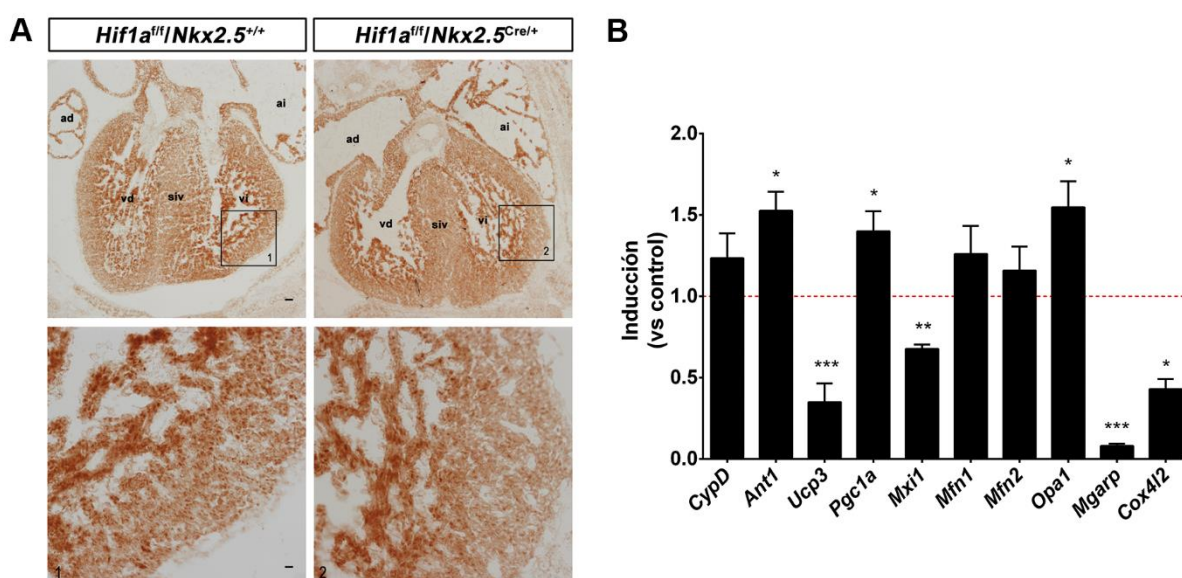


Figura 54 – Alteraciones en la actividad y dinámica mitocondrial en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Secciones representativas de tejido no fijado de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) a E14.5 teñidos para actividad COX4. Las barras de escala representan 100µm (paneles superiores) y 20µm (recuadros del ventrículo izquierdo). **B)** Análisis por qPCR de genes relacionados con biogénesis y dinámica mitocondrial en tejido ventricular de embriones mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3-6) representan la inducción relativa a la expresión basal de controles hermanos de camada (línea roja). *p<0.05, **0.005<p<0.01, ***p<0.005, test t de Student. ad: aurícula derecha, ai: aurícula izquierda, vd: ventrículo derecho, vi: ventrículo izquierdo, siv: septo interventricular.

En conjunto, estos resultados muestran que la delección de *Hif1a* no impacta negativamente en el establecimiento de una red mitocondrial activa. Al contrario, la delección de *Hif1a* favorece un programa transcripcional principalmente orientado a la biogénesis y a la fusión mitocondrial. Además, el incremento transcripcional de *Pgc1a* en ausencia de *Hif1a*, unido al hecho de que el mismo gen mostró expresión inhibida en el mutante *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 29B), apunta a una regulación de HIF1α sobre este gen en el corazón en desarrollo.

Por otro lado, teniendo en cuenta el patrón dinámico de la expresión de HIF1α (Fig.7) y que los niveles de proteína son elevados a E12.5 en el MC, cabría esperar un posible efecto de la pérdida de *Hif1a* sobre la red mitocondrial a este tiempo y no a E14.5, cuando los niveles endógenos de HIF1α son tan

reducidos. Por ello, se determinó el número de mitocondrias mediante MET a E12.5 en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 55A). La cuantificación de las imágenes (Fig. 55B) mostró que a E12.5 el mutante *Hif1a/Nkx2.5* mantiene la compartimentalización existente en los embriones control entre el MC y las trabéculas. Sin embargo, el número total de mitocondrias estaba incrementado en ambas capas. Del mismo modo, el análisis por MET en el doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* (Fig. 55C) mostró un resultado similar de maduración adelantada a E12.5 (Fig. 55D).

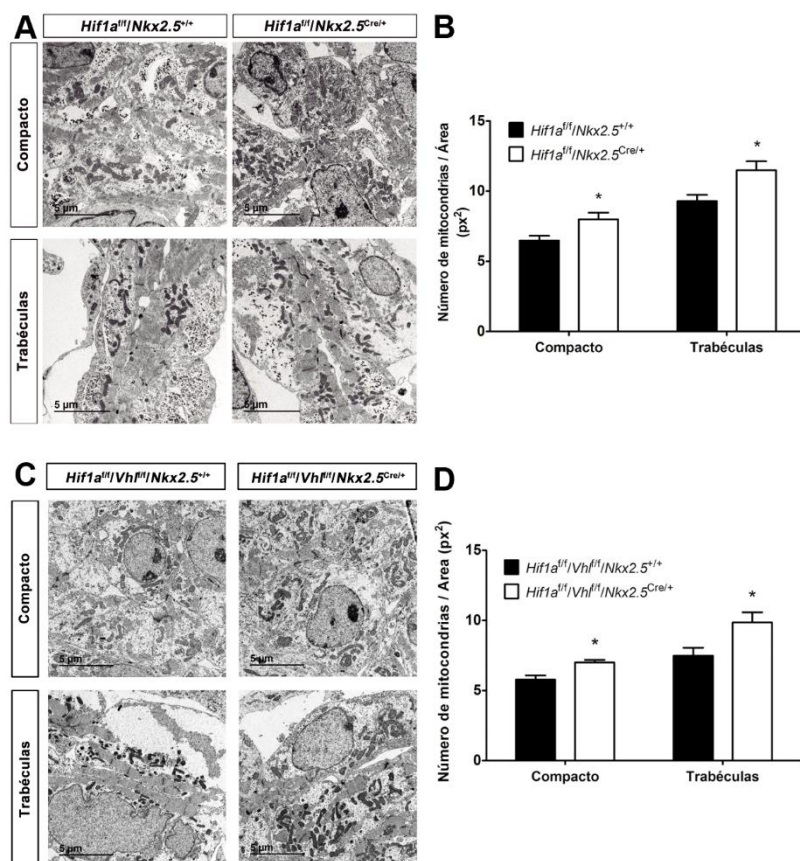


Figura 55 – Alteraciones en la distribución mitocondrial en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* y dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* a E12.5

A y C) Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de corazones a E12.5 de embriones control y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (panel A) y embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y doble mutante (*Hif1a^{fl/fl}/Vhl^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, panel C). En ambos casos se muestran tanto el miocardio compacto (arriba) como las trabéculas (abajo). **B y D)** Cuantificación del número de mitocondrias en embriones control (barras negras en B) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (barras blancas en B) y embriones control (barras negras en D) y dobles mutantes (barras blancas en D). Los resultados se expresan como número de mitocondrias por área de tejido (px²). En ambos casos, se presenta media±SEM (n=4), *p<0.05, test t de Student.

En suma, estos resultados sugieren que la pérdida de *Hif1a* activa mecanismos adaptativos en etapas anteriores a E14.5 que aseguran la obtención de ATP de manera independiente de la glucólisis, mediante un incremento del número de mitocondrias y una maduración prematura del metabolismo oxidativo.

3.5.4 Adaptaciones metabólicas en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Si bien los mutantes deficientes en *Hif1a* presentan un incremento en el contenido mitocondrial a E12.5, para una correcta adaptación metabólica también es necesaria la disponibilidad de un sustrato a oxidar que garantice el flujo de electrones a través de los complejos mitocondriales y que permita la obtención de ATP mediante fosforilación oxidativa. Sin embargo, los niveles de AG circulantes en la circulación fetal a estos estadios son muy bajos (Lopaschuk y Jaswal, 2010). Además, no se detectaron alteraciones en la expresión de genes relacionados con la oxidación de AG a E12.5 mediante RNASeq.

Los aminoácidos, por otra parte, garantizan el correcto funcionamiento del ciclo de Krebs en ausencia de otros sustratos mediante activación de las vías anapleróticas. En ausencia de un metabolismo eficaz de hidratos de carbono, y dada la disponibilidad limitada de AG a E12.5, esta posibilidad podría explicar un mecanismo metabólico de adaptación que permita un correcto desarrollo y crecimiento del miocardio en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Curiosamente, entre los genes diferencialmente expresados en el análisis de expresión por RNASeq se encontraron diversos genes relacionados con el metabolismo y transporte de aminoácidos. El análisis por Ontología Génica contra la base de datos de procesos biológicos de Panther mostró alteraciones en procesos metabólicos y de transporte de aminoácidos significativamente incrementados en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 56A).

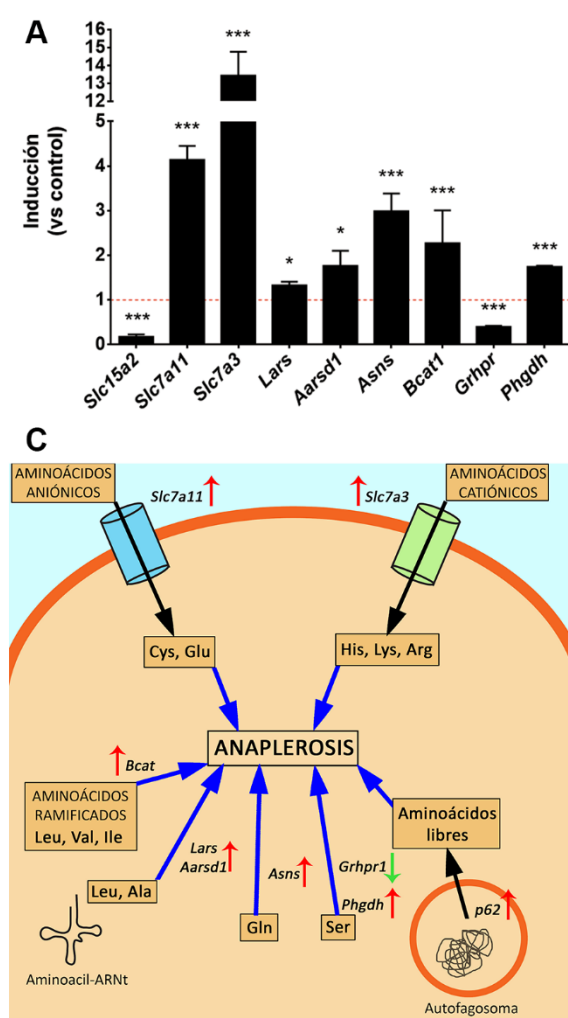


Figura 56 – Análisis de expresión de genes de transporte y metabolismo de aminoácidos en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Análisis de expresión mediante RNASeq de genes relacionados con metabolismo y transporte de aminoácidos a E12.5. Las barras (media±SEM, n=3) representan la inducción en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{+/+}*, línea roja). **B)** Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con metabolismo y transporte de aminoácidos a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3-5) representan la inducción en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (línea roja). Para todos los gráficos, *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student. **C)** Resumen esquemático integrando las alteraciones transcripcionales con las rutas anapleróticas de los aminoácidos. Las flechas rojas indican incrementos en la expresión. Las flechas verdes indican inhibición de la expresión.

La comprobación por PCR cuantitativa a E14.5 (Fig. 56B) confirmó un aumento en la expresión de algunos de estos genes en los corazones deficientes en *Hif1a*, como el transportador de aminoácidos aniónicos, especialmente glutamato y la forma aniónica de la cistina, xCT (*Slc7a11*) y el transportador de aminoácidos catiónicos 3 CAT3 (*Slc7a3*). También estaba incrementada la expresión de *Lars* (Leucil-ARNt-sintetasa, del inglés *Leucyl-TRNA Synthetase*), *Aarsd1* (que contiene un dominio de alanil-ARNt-sintetasa, del inglés *Alanyl-TRNA Synthetase Domain Containing 1*), *Asns* (Asparagina Sintetasa, del

inglés *Asparagine Synthetase*), que cataliza la interconversión de aspartato y glutamina en asparagina y glutamato, y de *Bcat1* (Aminotransferasa de aminoácidos ramificados 1, del inglés *Branched Chain Aminoacid Transaminase 1*), que participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina, generándose glutamato en el proceso. Además, también se encontró incrementada la expresión de *Grhpr1* (Glioxilato y hidroxipiruvato reductasa 1, del inglés *Glyoxylate and HydroxyPyruvate Reductase 1*) y *Phgdh* (Fosfoglicerato deshidrogenasa, del inglés *Phosphoglycerate Dehydrogenase*), ambas implicadas en la degradación de serina. Por otro lado, la expresión del transportador de oligopéptidos (*Slc15a2*) estaba inhibida en el mutante *Hif1a/Nkx2.5*, sugiriendo una preferencia en la incorporación de aminoácidos libres y no en forma de péptidos de pequeño tamaño.

Para tratar de detectar cambios en los niveles de metabolitos relacionados con estas diferencias en la expresión génica se realizó un análisis metabolómico mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón en corazones de E12.5 en embriones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. La cuantificación de los espectros (Fig. 57A) mostró un descenso en los niveles de taurina en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*, así como un incremento en los niveles de glutamina y de ácidos grasos (Fig. 57B).

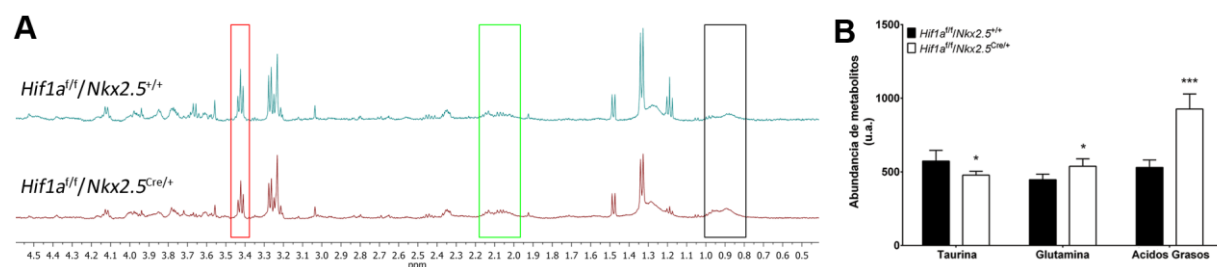


Figura 57 – Análisis metabolómico en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5

A) Espectro de RMN-¹H de las regiones alifáticas de muestras ventriculares representativas de embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, arriba) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, abajo) a E12.5. Los recuadros marcan las señales de la taurina (rojo), la glutamina (verde) y los ácidos grasos (negro). **B)** Cuantificación de la abundancia relativa de metabolitos a partir de los espectros para los embriones control (barras negras) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (barras blancas). Las barras representan media±SEM (n=4). *p<0.05, ***p<0.005, t de Student.

El incremento observado en los AG puede ser indicativo de un mayor flujo metabólico de los mismos, hecho que se ve justificado por el incremento transcripcional en genes implicados en la incorporación celular de AG, especialmente *Lpl* (Fig. 52A). Asimismo, el incremento observado en los niveles de glutamina coincide con la hipótesis de una mayor activación de rutas anapleróticas en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Finalmente, el descenso observado en los niveles de taurina puede estar relacionado con la función esencial de este ácido sulfónico como componente esencial de ciertos ARN de transferencia mitocondriales (Suzuki y cols., 2002). Una mayor síntesis de los mismos, como ocurre con *Lars* y *Asns* (Fig. 56), codificados por el genoma nuclear, podría justificar este descenso. Por otra parte, puesto que la síntesis de la taurina tiene lugar a partir de cistina, un consumo de aminoácidos mediante anaplerosis mitocondrial reduciría las reservas de precursores disponibles para su síntesis.

En conjunto, estos resultados sugieren que la privación de la glucólisis en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* tras la pérdida de *Hif1a* permite la aparición de adaptaciones metabólicas consistentes en el uso de los aminoácidos como fuente de energía (Fig. 56C).

La respuesta transcripcional observada también sugiere una mayor incorporación de aminoácidos al interior celular en respuesta al incremento en la expresión de los transportadores. El aumento intracelular de aminoácidos podría estar activando la ruta de mTOR, la ruta de señalización que activa la síntesis de proteínas regulando positivamente los procesos de traducción. Dos marcadores para determinar el estado de activación de esta vía son la fosforilación de la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), que regula positivamente los procesos de traducción, y la fosforilación de la proteína de unión al factor de traducción E4 (E4BP-1, del inglés *E4 Binding Protein 1*), que actúa positivamente sobre la traducción al permitir la liberación del factor E4. Para determinar el estado de activación de estas vías en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* se analizó, en primer lugar, la fosforilación de S6K (pS6K) en el residuo Thr3897 mediante inmunohistoquímica a E12.5 (Fig. 58A). Los resultados muestran un sensible descenso en los niveles de pS6K, tanto en el endocardio como en el MC. Por otro lado, el análisis de la fosforilación de E4BP-1 (pE4BP-1) en los residuos Thr37 y Thr46 mediante Western-Blot en corazones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5 (Fig. 58B) no mostró diferencias entre ambos (Fig. 58C). Estos resultados sugieren que, si bien se está produciendo un incremento de aminoácidos intracelulares al favorecerse su transporte, su uso está dirigido a procesos diferentes a la síntesis de proteínas.

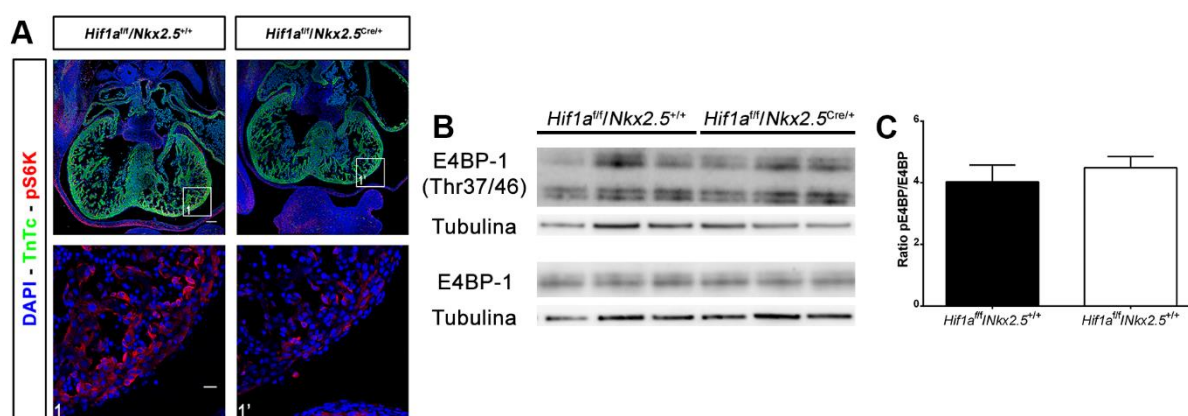


Figura 58 – Análisis de la ruta de mTOR en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a E12.5

A) Inmunofluorescencia para S6K fosforilada en Thr389 (pS6K, rojo) y Troponina T (verde) en embriones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) a E12.5. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul. Las barras de escala representan 100µm y 20µm en los recuadros del ventrículo izquierdo. **B)** Imágenes de Western-Blot de corazones embrionarios a E12.5 de embriones control y mutante *Hif1a/Nkx2.5* contra E4BP-1 fosforilada en Thr37 y Thr46, así como E4BP-1 total. La tubulina se empleó como control de carga. **C)** Cuantificación de la intensidad de las bandas en el control (barra negra) y en el mutante *Hif1a/Nkx2.5*, como ratio E4BP-1 fosforilada respecto a E4BP-1 total (media±SEM), test t de Student (n=4).

Además de la incorporación de aminoácidos del medio extracelular, las células pueden activar, de forma controlada, procesos de autofagia que permitan obtener aminoácidos en periodos de escasez de nutrientes. Considerando que el metabolismo cardiaco de los embriones deficientes en *Hif1a* podría

estar basado en el catabolismo de aminoácidos, al menos hasta E14.5, dada la limitada disponibilidad de AG a etapas anteriores (Lopaschuk y Jaswal, 2010), la activación de rutas autofágicas podría suponer un aporte extra de metabolitos energéticos (Fig. 56C). Para valorar esta hipótesis, se cuantificó por PCR cuantitativa el nivel de expresión de diversos genes implicados en rutas autofágicas a E14.5 (Fig. 59). Se observó un incremento en la expresión de *p62*, proteína adaptadora implicada en el reconocimiento de los sustratos a degradar. Al mismo tiempo, de manera contraria a lo observado en el mutante de *Vhl*, se observó un descenso significativo en los niveles de expresión de *Bnip3* y *Nix*, sugiriendo que el bloqueo de esta ruta mitofágica podría contribuir al aumento de mitocondrias observado a E12.5.

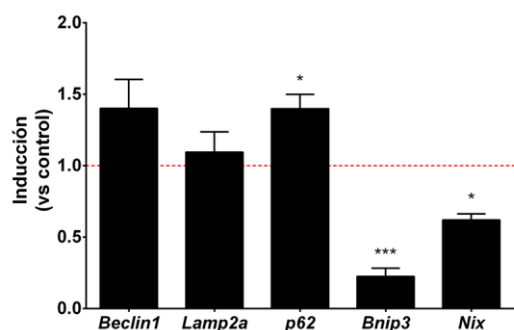


Figura 59 – Análisis de la autofagia en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con procesos de autofagia a E14.5. Las barras (media±SEM, n=3-5) representan la inducción en el mutante *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) en relación a la expresión basal en controles hermanos de camada (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, línea roja). *p<0.05, ***p<0.005, test t de Student.

3.6 Análisis de la estructura y la función cardiaca en mutantes *Hif1a/Nkx2.5* adultos

Como muestran, en conjunto, los resultados obtenidos tras la caracterización del mutante *Hif1a/Nkx2.5*, la pérdida de *Hif1a* no parece ser esencial para el correcto desarrollo del corazón. Sin embargo, no se puede descartar que las alteraciones metabólicas descritas tras la delección de *Hif1a* tengan consecuencias morfológicas o funcionales durante la vida adulta de los ratones mutantes. Para determinar posibles alteraciones posteriores al desarrollo embrionario asociadas a la pérdida de *Hif1a*, se analizaron corazones control y deficientes en *Hif1a* a 5 meses de edad. El análisis morfológico mediante tinción hematoxilina-eosina no reveló diferencias aparentes entre los corazones control y los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 60A). Además, mediante tinción de Tricrómico de Mason se descartó la presencia de áreas de fibrosis en los corazones mutantes (Fig. 60B).

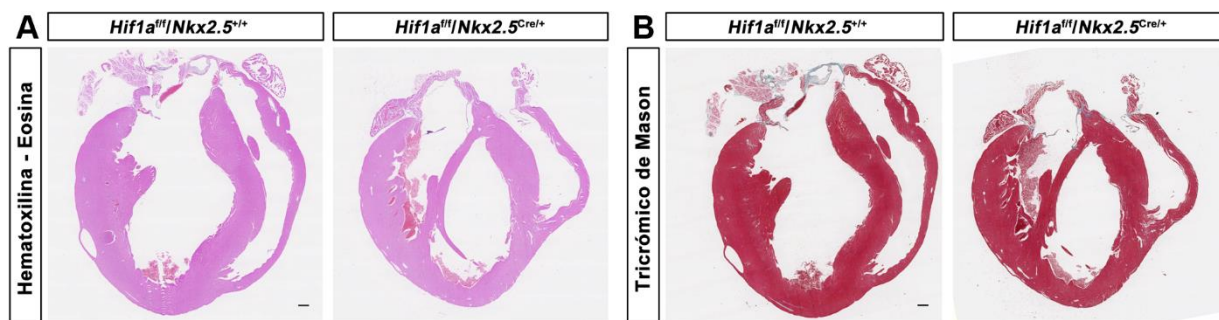


Figura 60 – Análisis histológico de los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a 5 meses de edad

A) Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de corazones control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) a 5 meses de edad. **B)** Secciones teñidas con Tricrómico de Mason de corazones control y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a 5 meses de edad. En todos los casos, las barras de escala representan 300µm.

Si bien la pérdida de *Hif1a* no parecía causar alteraciones morfológicas en los corazones de los mutantes adultos, no se podía descartar una alteración en la función cardíaca de los mismos. Por ello, se llevó a cabo un análisis funcional de los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* a 5 meses de edad mediante técnicas de ecocardiografía. El análisis en modo bidimensional (Fig. 61A, paneles superiores) no mostró alteraciones significativas en el grosor de la pared posterior del VI (Fig. 61B), en el grosor del SIV (Fig. 61C) ni en el volumen telediastólico del VI (Fig. 61D), confirmando las observaciones histológicas. Por otra parte, la relación de la masa del corazón respecto a la masa corporal no mostró diferencias entre el control y el mutante *Hif1a* (Fig. 61E), descartándose la existencia de cardiomegalia o hipertrofia. Asimismo, el análisis de contractilidad mediante modo M (Fig. 61A, paneles inferiores) no mostró diferencias en la función cardíaca entre los animales control y los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*, tanto en términos de fracción de eyección (Fig. 61F) como de fracción de acortamiento (Fig. 61G).

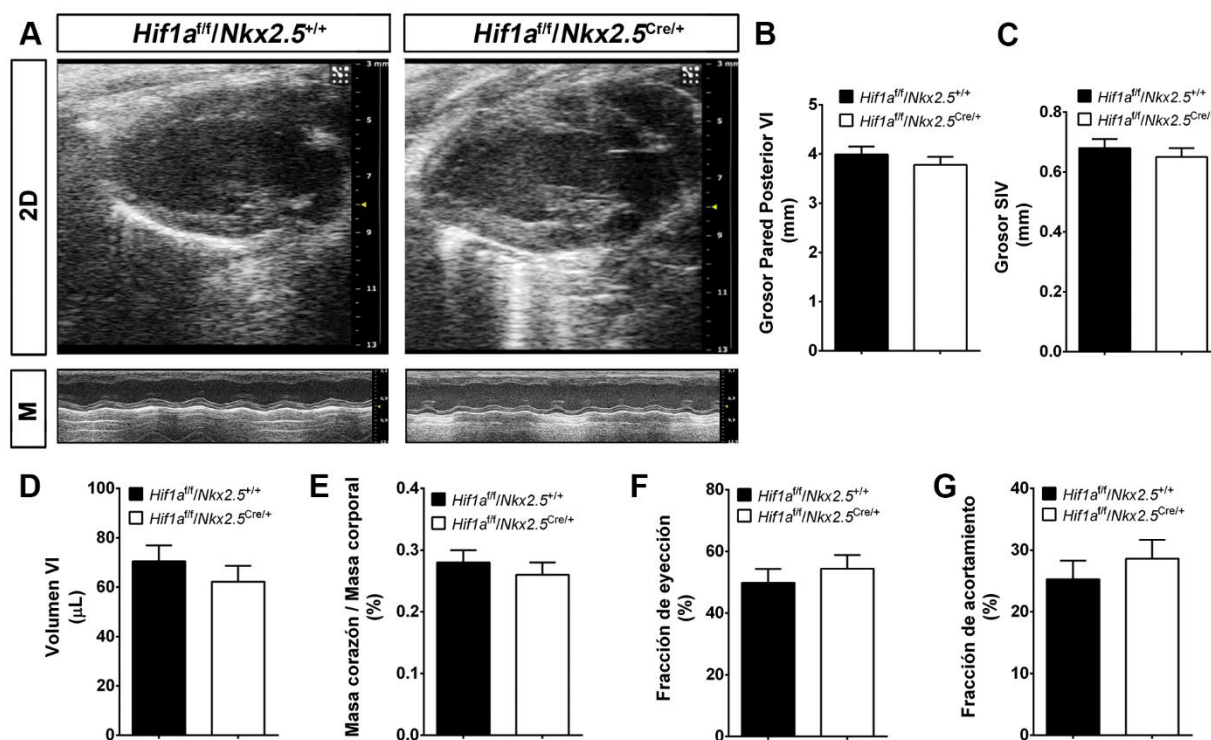
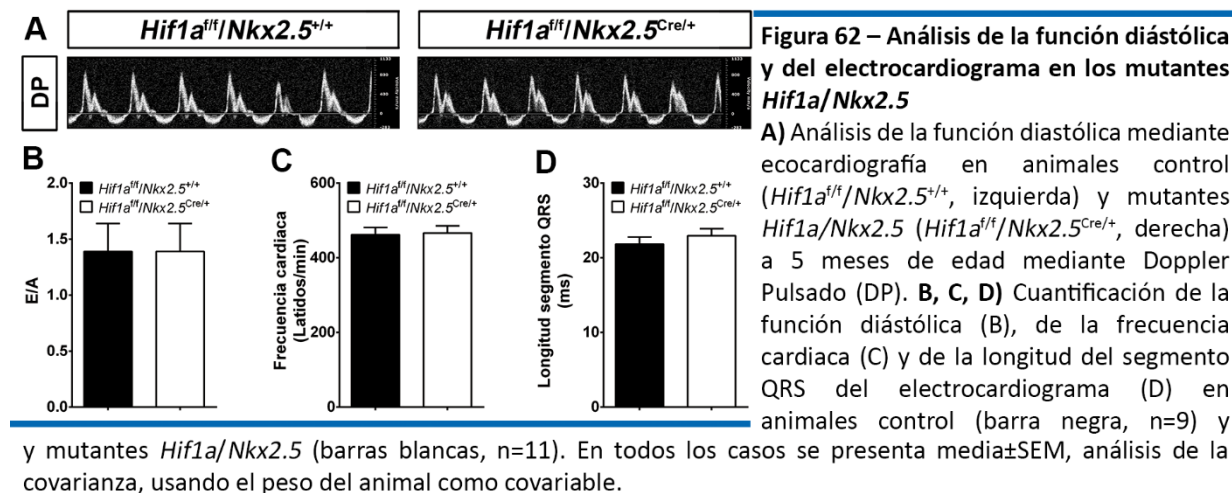


Figura 61 – Análisis de la función cardíaca en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*

A) Análisis de la función cardíaca mediante ecocardiografía en animales control (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{+/+}*, izquierda) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, derecha) a 5 meses de edad. Se muestran el modo bidimensional y el modo monodimensional o M (paneles inferiores). **B, C, D)** Cuantificación del grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (B), del grosor del septo interventricular (C) y del volumen del ventrículo izquierdo (D) a partir de las ecocardiografías en embriones control (barra negra, n=9) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (barras blancas, n=11). **E)** Relación entre la masa del corazón y el peso del animal en controles (n=9) y mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (n=11). **F y G)** Cuantificación de las fracciones de eyección (F) y de acortamiento (G) del ventrículo izquierdo en animales control (n=9) y mutante *Hif1a/Nkx2.5* (n=11). En todos los casos se presenta media±SEM. Para E, test t de Student. Para el resto de gráficas, análisis de la covarianza, usando el peso del animal como covariable.

Además, el análisis del llenado mitral mediante Doppler Pulsado (Fig. 62A) descartó la existencia de disfunción diastólica en los corazones deficientes en *Hif1a* (Fig. 62B). Al mismo tiempo, el análisis del

electrocardiograma no mostró diferencias en la frecuencia cardíaca (Fig. 62C) ni en la longitud del segmento QRS (Fig. 62D), descartando problemas de arritmogénesis o de contractilidad.



Estos resultados confirman que, al menos hasta la edad de 5 meses, la pérdida de *Hif1a* no provoca alteraciones morfológicas ni funcionales en condiciones de homeostasis. Sin embargo, no puede descartarse que la pérdida de HIF1α se manifieste en condiciones más desfavorables, como en un contexto isquémico o ante una situación de esfuerzo.

DISCUSIÓN

1 DISTRIBUCIÓN DE HIF1 α EN EL CORAZÓN EMBRIONARIO

Los resultados obtenidos describen la distribución heterogénea de HIF1 α en el corazón embrionario y la existencia de dos regulaciones diferenciadas. Por una parte, observamos un gradiente espacial, consistente en la presencia de mayores niveles de HIF1 α en el MC y su progresiva exclusión de las trabéculas entre E9.5 y E12.5 a medida que éstas se desarrollan. Por otro lado, existe un control temporal de la expresión de HIF1 α , que refleja un descenso gradual en los niveles de HIF1 α entre E9.5 y E14.5 (Fig. 7). Si bien trabajos previos han descrito la presencia de HIF1 α en el corazón en desarrollo (Guimaraes-Camboa y cols., 2015; Huang y cols., 2004; Krishnan y cols., 2008), los resultados de nuestro grupo describen la existencia de territorios de expresión diferencial de HIF1 α en las regiones anatómicas del corazón en desarrollo (Menendez-Montes y cols., 2016). Por otra parte, Guimaraes-Camboa y colaboradores plantean una posible regulación en la translocación nuclear de HIF1 α durante la cardiogénesis en base a la detección que realizan mediante inmunofluorescencia y análisis de imagen a grandes aumentos, en el cual observan acumulación citoplasmática de HIF1 α a estadios tempranos (E9.5) y señal nuclear a estadios posteriores (Guimaraes-Camboa y cols., 2015). Estos resultados no coinciden con nuestras observaciones, según las cuales, la señal de HIF1 α es claramente nuclear, y por tanto funcional, en todos los estadios analizados, incluso a baja magnificación (Fig. 7). Nuestra experiencia en inmunodetección de HIF1 α y la complejidad técnica en su detección nos lleva a cuestionar las conclusiones del trabajo de Guimaraes-Camboa y colaboradores ya que, en situaciones no óptimas de tinción, nosotros también hemos detectado señal citoplasmática de HIF1 α , no sólo a E9.5, sino a otros estadios. Además, si bien serían necesarios más estudios a nivel molecular para descartar la existencia de una regulación a nivel de localización subcelular de HIF1 α , no existe un soporte bibliográfico sólido que apoye la existencia de dicho mecanismo *in vivo*. Por otro lado, la señal positiva para GLUT1, cuya expresión está regulada por HIF1 α en el miocardio, en las mismas regiones en las que se observa señal nuclear de HIF1 α a todos los estadios analizados (Fig. 8A), aporta una evidencia adicional que confirma que la señal citoplasmática observada por Guimaraes-Camboa y colaboradores probablemente sea debida a problemas técnicos en la inmunodetección de HIF1 α .

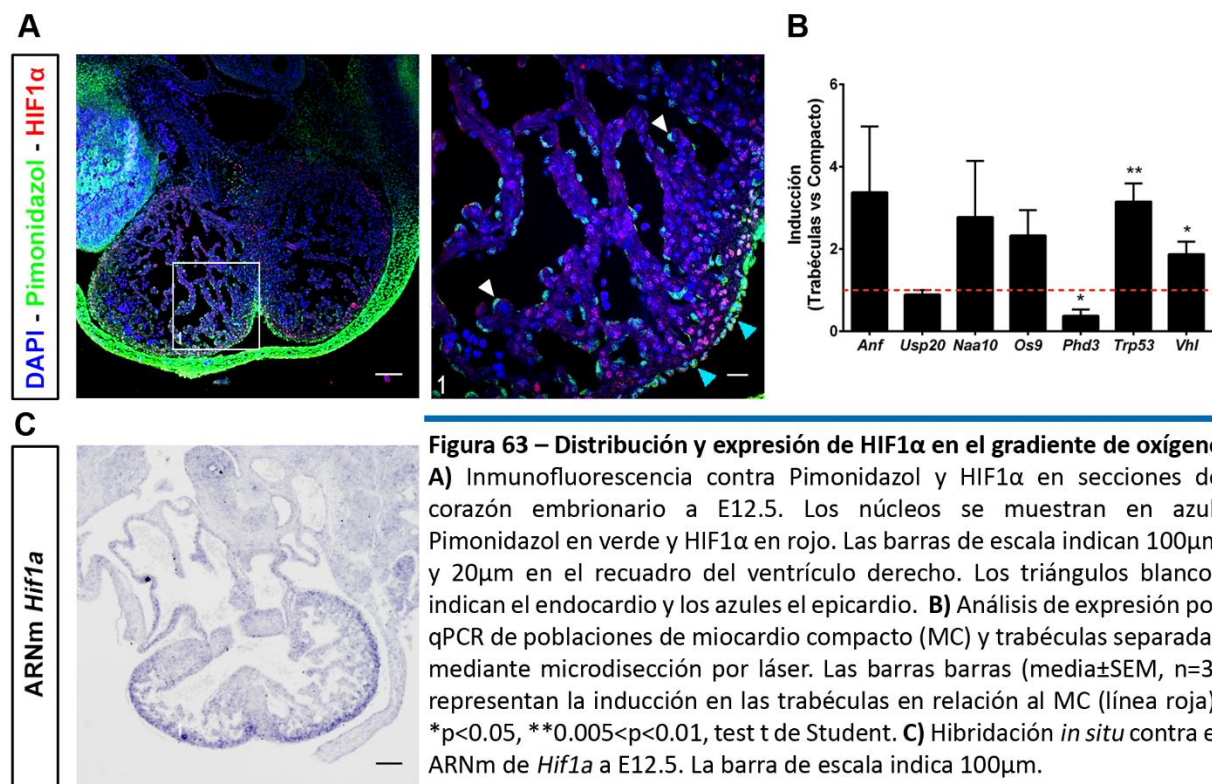
Según la regulación canónica de este factor (Fig. 4), la posible explicación a la distribución heterogénea de HIF1 α descrita podría ser la existencia de un gradiente de oxígeno en el corazón embrionario, con bajos niveles en el MC, que justifiquen la estabilización de HIF1 α , y niveles más altos de oxígeno en las trabéculas, que impedirían su presencia. Un método clásico de detección de regiones hipóxicas es el marcaje con pimonidazol, una sonda química que se une a estructuras celulares por debajo de un 2% de O₂ formando aductos detectables por medio de anticuerpos específicos (Varia y cols., 1998). Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que a E12.5 la señal de pimonidazol está restringida al pericardio, así como al epicardio y endocardio, pero no se detecta señal en el MC (Fig.

63A), región preferente de expresión de HIF1 α a este estadio (Fig. 7). Esta exclusión de la señal de pimonidazol en el MC apunta a la existencia de mecanismos de regulación adicionales al oxígeno.

Por otro lado, la detección del ARNm de *Hif1a* a E12.5 mediante hibridación *in situ*, revela un mayor nivel de expresión de *Hif1a* en el MC respecto a las trabéculas (Fig. 63B), sugiriendo la existencia de una regulación a nivel del promotor de HIF1. En esa línea de razonamiento, existen mecanismos de estabilización de la proteína HIF1 α alternativos a la ruta canónica, consistentes en el descenso de la expresión de genes relativos a degradación de proteínas y el incremento de genes relacionados con desubiquitinización. Estos mecanismos, junto con la inhibición transcripcional de las prolil-hidroxilasas *Phd1* y *Phd3*, operan, por ejemplo, en pequeñas agrupaciones de cardiomiocitos HIF1 α positivos en el corazón de ratón adulto (Kimura y cols., 2015). Para tratar de determinar si estas vías pudieran estar actuando en el corazón embrionario, se realizó un estudio piloto en colaboración con este laboratorio (UTSW, Dallas, EEUU), consistente en la separación de cardiomiocitos del MC y de las trabéculas a E12.5 mediante microdissección por láser y posterior análisis de expresión de genes relacionados con estos mecanismos mediante PCR cuantitativa (Fig. 63B). Curiosamente, estos resultados preliminares mostraron una expresión trabecular incrementada significativamente, o con tendencia a incrementarse, de genes reguladores negativos de HIF1 α , como la N-alfa Acetiltransferasa (*Naa10*), que estimula la degradación proteasomal de HIF1 α (Jeong y cols., 2002), la lectina del retículo endoplasmático *Os9*, que promueve la degradación de HIF1 α a través de las PHDs (Baek y cols., 2005) y la proteína tumoral P53 (*Trp53*, del inglés *Tumor Protein 53*), que promueve ubiquitinación y degradación de la subunidad 1 α (Ravi y cols., 2000). Además, se observó un incremento relativo en la expresión del propio *Vhl*, así como un descenso en los niveles de expresión de *Phd3*, una diana clásica de HIF1 α . Sin embargo, la peptidasa específica de ubiquitina 20 (*Usp20*, del inglés *Ubiquitin Specific Peptidase 20*), que desubiquitina HIF1 α , aumentando su estabilidad (Li y cols., 2005), no presentó diferencias de expresión entre MC y trabéculas, aunque no puede descartarse que otros miembros de esta familia se expresen diferencialmente entre ambas capas del corazón. Por otro lado, se observó un aumento en la expresión de *Anf*, un marcador de trabéculas, lo que indica una correcta segregación de las poblaciones durante el proceso de microcaptura por láser.

Por último, para ahondar en los posibles mecanismos responsables de la expresión heterogénea de HIF1 α , se realizó un análisis de la expresión del ARNm de *Hif1a* a E12.5 mediante hibridación *in situ*. Los resultados revelan un mayor nivel de expresión de *Hif1a* en el MC respecto a las trabéculas a este estadio (Fig. 63C), sugiriendo la existencia de una regulación a nivel del promotor de HIF1 de manera independiente de los niveles de oxígeno. Este tipo de regulaciones a nivel transcripcional, mediante el aumento de la expresión del gen de manera local y saturación del sistema de degradación celular, sucede durante la expresión de MYC en respuesta a altos niveles de glucosa (Doe y cols., 2012), a través de la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP, del inglés *Carbohydrate*

Response Element Binding Protein) (Isoe y cols., 2010) o por activación de la proteína quinasa C (PKC) (Pagé y cols., 2002).



En su conjunto, estos resultados, si bien preliminares, sugieren la existencia de vías de estabilización de HIF1α independientes de oxígeno en el corazón en desarrollo, además de abrir nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos moleculares que regulan la dinámica espacial y temporal de HIF1α en el miocardio embrionario. No obstante, es importante considerar que la mayor estabilización de HIF1α en el MC podría ser consecuencia de una adaptación metabólica. En ese sentido, un ambiente hipóxico en etapas tempranas del desarrollo estabilizaría HIF1α, con la consiguiente reprogramación metabólica hacia un metabolismo no oxidativo basado en la glucólisis. De este modo, el descenso en el consumo celular de oxígeno podría alterar la señal de pimonidazol observada, aún en condiciones de estabilización de HIF1α.

Aunque los resultados previos mostrados (Fig. 63) sugieren la existencia de mecanismos reguladores alternativos al oxígeno entre el MC y las trabéculas, esta hipótesis metabólica podría explicar la señal de pimonidazol diferente entre dos compartimentos celulares tan próximos como el MC y el endocardio o el epicardio. Por tanto, será necesaria una caracterización más profunda de estas posibles vías de regulación para determinar de manera concluyente los mecanismos que establecen el patrón heterogéneo de HIF1α en el miocardio embrionario.

2 INTEGRACIÓN CON MODELOS PREVIOS DE DELECIÓN CARDIACA

A pesar de que se han descrito varios modelos de delección condicional de *Hif1a* en corazón, existe una gran discrepancia entre ellos, limitando la determinación del papel que juega HIF1 durante la cardiogénesis y homeostasis cardiaca (Guimaraes-Camboa y cols., 2015; Huang y cols., 2004; Krishnan y cols., 2008). Sin embargo, cabe mencionar que existen diferencias importantes entre los modelos experimentales previamente descritos y los presentados en esta Tesis Doctoral, que podrían explicar las diferencias observadas en el fenotipo de los distintos modelos. Por un lado, diversos trabajos previos de delección de *Vhl* emplean *Mlc2v-Cre* (Lei y cols., 2008) o *aMHC-Cre* (Neary y cols., 2014), que median recombinación en cardiomiocitos. Si bien estos trabajos demuestran el papel de la señalización VHL-HIF en las adaptaciones mitocondriales en la transición a la etapa posnatal coincidentes con el incremento en la disponibilidad de oxígeno, el patrón de recombinación que aportan estas líneas Cre es sólo parcial y no homogéneo en todo el compartimento del miocardio (*Mlc2v-Cre*, Lei y cols., 2008; *aMHC-Cre*, Li y cols., 2011). Sin embargo, los modelos de delección descritos en nuestro grupo usando *Nkx2.5-Cre*, permite una delección más temprana y completa respecto a las líneas Cre descritas en los trabajos previos (Figs. 10 y 40). Además, el uso en paralelo de *TnTc-Cre* nos ha permitido alcanzar un mayor grado de homogeneidad y una recombinación robusta a nivel de cardiomiocito respecto a los modelos anteriormente descritos. (Figs. 18, 24C y 51). Por tanto, nuestros resultados describen por primera vez un modelo de delección eficaz en una ventana de desarrollo cardiaco temprano/intermedio.

Por otro lado, varios modelos previos de delección de *Hif1a* emplean un alelo nulo delecionado en línea germinal en combinación con otro con delección específica de tejido según la línea Cre empleada (Guimarães-Camboa y cols., 2015; Huang y cols., 2004; Krishnan y cols., 2008). Dadas las alteraciones extra-cardiacas presentes en los modelos de delección global de *Hif1a* (Compennolle y cols., 2003; Iyer y cols., 1998; Ryan y cols., 1998), no puede descartarse que parte del fenotipo observado en estos trabajos que emplean un alelo nulo, y la discrepancia con nuestros resultados (Fig. 41), pueda deberse en parte a condicionantes y efectos colaterales asociados a la heterocigosidad en todo el embrión desde el estadio de cigoto.

En cualquier caso, nuestro análisis de expresión génica a E12.5 en la línea de pérdida de función en el linaje *Nkx2.5* sí coincide en la mayoría de los procesos alterados descritos por modelos previos. Nuestro análisis por RNASeq solapa especialmente con el estudio transcripcional llevado a cabo por Guimaraes-Camboa y colaboradores, que también emplean *Nkx2.5-Cre* para delecionar una copia de *Hif1a* en corazón en combinación con un alelo nulo (Guimarães-Camboa y cols., 2015). Es más, en ambos casos se observan alteraciones en la expresión de genes relacionados con procesos metabólicos, mitocondriales y de homeostasis iónica (Fig. 20). En vista del alto grado de solapamiento entre ambos análisis de expresión, y teniendo en cuenta los pocos procesos únicamente alterados en su mutante,

principalmente relacionados con rutas de estrés celular como ATF4 y P53, nos planteamos que la activación paralela de estas rutas, probablemente de manera secundaria a la delección de *Hif1a* en línea germinal, puedan ser responsables del fenotipo de letalidad descrito por los autores.

3 SEÑALIZACIÓN POR HIF1, METABOLISMO Y PROLIFERACIÓN

De acuerdo a los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, los territorios de expresión de HIF1 α observados en el corazón en desarrollo coinciden, tanto a nivel espacial como temporal, con la existencia de compartimentos metabólicos, existiendo una correlación positiva entre los niveles de HIF1 α y un programa glucolítico en el MC (Fig. 8), frente a un gradiente mitocondrial opuesto, enriquecido en las trabéculas carentes de HIF1 α (Fig. 9). El uso combinado de modelos de ganancia y pérdida de función (Figs. 10 y 40) nos ha permitido demostrar que HIF1 es la principal señalización implicada en el mantenimiento de estos compartimentos. Así, la presencia de HIF1 α en el MC mantiene activo un programa glucolítico, mientras que su exclusión de las trabéculas permite el establecimiento de una red mitocondrial más madura y activa que la presente en el MC, como demuestra el descenso en actividad y abundancia mitocondrial observado en el mutante *Vhl/Nkx2.5* (Figs. 28 y 29), acompañado de un incremento y conservación del programa glucolítico (Figs. 22A y 24). Es más, el descenso progresivo en los niveles de HIF1 α en el MC a medida que progresa la gestación provoca un descenso paulatino de enzimas glucolíticas y permite el aumento en el contenido mitocondrial y el subsiguiente establecimiento de un metabolismo oxidativo también en esta capa, como demuestra la adquisición precoz de una red mitocondrial a E12.5 en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (Figs. 49,50,55). Además, los resultados del análisis metabólico por RMN-¹H en el modelo *Vhl/Nkx2.5* confirman el incremento glucolítico en estos mutantes, al mostrar una acumulación de lactato significativa (Fig. 23).

El descenso progresivo en los niveles de HIF1 α también parece ser importante para el correcto crecimiento del miocardio embrionario, especialmente a nivel del MC, la región con mayor actividad proliferativa durante la cardiogénesis. Sin embargo, ni la ganancia (Fig. 17) ni la pérdida de función (Fig. 42), así como tampoco la doble delección de *Vhl* y *Hif1a* (Fig. 39) provocan alteraciones en el tamaño de los cardiomiocitos que pudiesen justificar el fenotipo observado. El papel de HIF1 en proliferación parece ser altamente dependiente del contexto biológico en el que se estudie. En determinados contextos, como en células madre mesenquimales (Ciria y cols., 2017) o en hepatocarcinomas (Jiao y Nan, 2012) HIF1 puede activar y mantener la proliferación celular. Sin embargo, HIF1 también puede tener un papel anti-proliferativo en otros contextos como, por ejemplo, activando parada de crecimiento en fibroblastos embrionarios de ratón o linfocitos B (Goda y cols., 2003), o mediante la activación de P21 y la inhibición de *Cdc25a*, que mantiene la actividad de CDK2 en células humanas de cáncer de colon (Hammer y cols., 2007). En el caso concreto del miocardio embrionario, la ausencia de HIF1 α en el modelo *Hif1a/Nkx2.5* no afecta a los niveles de proliferación de los cardiomiocitos (Fig.

46B,C). Sin embargo, el incremento en sus niveles tras la delección de *Vhl* provoca un descenso en la tasa de proliferación y un adelgazamiento evidente del MC (Figs. 11, 12 y 21C,D). Este efecto es claramente HIF1 α dependiente, al verse rescatado el fenotipo en el doble mutante *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*, donde se previene el aumento de los niveles de HIF1 α tras la pérdida de *Vhl* por la delección simultánea de *Hif1a* (Fig. 14). Además, el hecho de que a E10.5 la proliferación en el modelo *Vhl/Nkx2.5* no esté afectada ni se observe un fenotipo aparente (Fig.15), sugiere que este efecto es crítico en etapas posteriores a E10.5, cuando HIF1 α se restringe al MC, el cual a su vez presenta cierto grado de heterogeneidad, al contar con un pequeño número de cardiomiocitos negativos para HIF1 α . Este adelgazamiento en el MC también se ha observado previamente en mutantes para el gen *Bmp10*. En ese caso, la ausencia de BMP10 elimina la represión sobre *p57*, provocando parada del ciclo celular, descenso en la proliferación y el mencionado adelgazamiento del MC (Chen y cols., 2004). Curiosamente, en nuestro modelo de ganancia de función, los niveles mantenidos de HIF1 α resultan en una reducción en la expresión de *Bmp10* (Fig. 21A) y esta reducción está asociada a un aumento en la expresión de *p57* (Fig. 21B). Este efecto parece estar mediado por un mecanismo represor dependiente de HIF1, al no existir alteraciones en los niveles de *Bmp10* en el modelo de pérdida de función *Hif1a/Nkx2.5* (Fig.46A). Además, modelos previos de delección de *Hif1a*, tanto globales como específicos de corazón, describen fenómenos de hiperplasia (Krishnan y cols., 2008; Ryan y cols., 2000; Semenza y cols., 1999).

Por otro lado, hemos identificado mecanismos adicionales que apoyan la idea de una parada del crecimiento cardiaco en el mutante *Vhl/Nkx2.5*. En primer lugar, el análisis por RNASeq muestra una clara inducción de genes relacionados con parada de ciclo celular y respuesta a daño en el ADN. Entre ellos se encuentra *Cdkn1a*, la ciclina G2 (*Ccng2*, del inglés *Cell-Cycle Negative Regulator 2*), el transcrito 4 inducible por daño en el ADN (*Ddit4*, del inglés *DNA-Damage-Inducible Transcript 4*), el inhibidor 1 de la retroalimentación del receptor ERBB (*Errfi1*, del inglés *ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1*) y las queratinas 18 y 19 (*Krt18*, *Krt19*). Además, la pérdida de *Vhl* también activa la expresión de genes implicados en parada del crecimiento, como el gen 45g inducible por daño al ADN y parada de crecimiento (*Gadd45g*, del inglés *Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 45g*), el gen 2 específico de parada de crecimiento (*Gas2*, del inglés *Growth Arrest-Specific 2*) y su gen tipo 3 relacionado (*Gas2l3*, del inglés *Growth Arrest-Specific 2-Like 3*). La conclusión de que es el aumento en los niveles de HIF1 α el responsable de la pérdida de actividad proliferativa en el MC (Fig. 21), así como de la parada del crecimiento en corazones deficientes en *Vhl* (Figs. 11 y 12), se ve reforzada por el hecho de que la mayoría de estos genes forman parte de la respuesta transcripcional inducida por hipoxia en otros contextos de regulación de proliferación, como el efecto negativo de HIF1 descrito en la progresión de ciertos tipos de tumores (Goda y cols., 2003; Gordan y cols., 2007; Hammer y cols., 2007).

Sin embargo, estos resultados están en conflicto con el papel de HIF1 como activador de la proliferación de cardiomiocitos embrionarios descrito previamente (Guimarães-Camboa y cols., 2015). Como se ha

comentado más arriba, la pérdida en línea germinal de un alelo de *Hif1a* en este modelo podría tener efectos extra-cardíacos que activen respuestas de estrés causantes de la parada de crecimiento observada. Es más, esta estrategia también evade la pérdida de posibles funciones de VHL independientes de HIF1 relacionadas con senescencia celular y apoptosis (Guo y cols., 2009; Young y cols., 2008), que podrían jugar un papel en el fenotipo de nuestro modelo de ganancia de función. Estas acciones adicionales de VHL también podrían intervenir en el desarrollo cardíaco y contribuir a la letalidad embrionaria observada en los mutantes simples *Vhl/Nkx2.5*. De hecho, los dobles mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5* también presentan letalidad embrionaria, sin adelgazamiento del MC, pero con evidentes defectos del SIV y de las válvulas aórticas a E17.5 (Fig. 37). Esta letalidad sugiere que, si bien el defecto en proliferación de los mutantes deficientes en *Vhl* se debe principalmente a la señalización mantenida de HIF1 α a E14.5, VHL podría jugar un papel fundamental en etapas más tardías de la gestación. Es más, el desarrollo normal y la ausencia de letalidad en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* apoya la idea de que es la pérdida de *Vhl*, y no la de *Hif1a*, la responsable de la letalidad en el modelo de doble delección. Por otro lado, como se discute más adelante, tampoco se puede descartar que un incremento de la isoforma HIF2 α , expresada principalmente en el endocardio, tras la delección de *Vhl* pueda jugar un papel en la letalidad observada. Sin embargo, la demostración definitiva de esta hipótesis requeriría una mayor caracterización del modelo de doble delección en etapas finales de la gestación. Por ejemplo mediante la valoración de la función cardíaca por ecocardiografía a estos estadios (E17.5), el análisis de defectos estructurales inmediatamente tras el nacimiento, así como una exhaustiva caracterización a nivel molecular a partir de tejido cardíaco de los dobles mutantes, mediante estudios de co-inmunoprecipitación de VHL o análisis de ubiquitinación de proteínas, para tratar de determinar posibles nuevas dianas de VHL en este contexto, así como analizar el estado de activación de la ruta de HIF2, principalmente en el compartimento endocárdico.

4 ADAPTACIONES MITOCONDRIALES A LA SEÑALIZACIÓN ALTERADA DE HIF1

Como se ha discutido en apartados previos, los territorios de expresión de HIF1 α existentes en el MC y las trabéculas se correlacionan con la presencia de compartimentos mitocondriales diferenciados. Los resultados obtenidos en el mutante *Vhl/Nkx2.5* muestran un reducido número de mitocondrias, tanto a nivel del MC como de las trabéculas, reduciéndose en conjunto el contenido mitocondrial del miocardio y desapareciendo la compartimentalización entre ambas capas existente en embriones control (Fig. 28). Esta pérdida del gradiente mitocondrial también es patente en términos de actividad COX4, presentando los mutantes deficientes en *Vhl* una actividad mitocondrial muy reducida en todo el miocardio (Fig. 29A). PGC1 α es uno de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2011). En el contexto del corazón adulto, la delección condicional de *Vhl* en corazón causa una reducción en los niveles de *Pgc1a*, mientras que la pérdida de *Hif1a* está relacionada con su

incremento (Krishnan y cols., 2009). Curiosamente, el descenso en el contenido mitocondrial que presenta el modelo de delección de *Vhl* descrito en esta Tesis Doctoral está acompañado de una expresión reducida de *Pgc1α*, tanto a E12.5 (RNASeq) como a E14.5 (PCR cuantitativa, Fig. 29C). Es más, el incremento mitocondrial precoz detectado a E12.5 en el mutante *Hif1α/Nkx2.5* es paralelo a un aumento moderado en la expresión de este gen (Figs. 54B, 55). Estos datos sugieren que los efectos represores de HIF1α sobre la biogénesis mitocondrial descritos en el corazón adulto podrían operar también en este contexto embrionario. Este efecto represor de HIF1α, que al ser un factor de transcripción generalmente media la activación de la expresión de sus genes diana, podría resultar contradictorio *a priori*. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la respuesta a hipoxia incluye la expresión de una serie de microARNs, denominados en conjunto hipoxamiRs. En concreto, *Pgc1α* se regula negativamente por el microARN miR696 (Aoi y cols., 2010), cuya expresión está inducida en hipoxia (Azzouzi y cols., 2015). Esta inducción podría suponer un mecanismo adicional para la acción inhibitoria de HIF1α sobre la biogénesis mitocondrial observada en el mutante *Vhl/Nkx2.5*. Además, se ha descrito previamente que, en contextos tumorales, HIF1α puede jugar un papel inhibidor al activar la expresión de represores transcripcionales que median la inhibición de *Pgc1α* (Zhang y cols., 2007). En concreto, HIF1α activa la expresión del gen de la proteína que interacciona con MAX (*Mxi1*, del inglés *Max-Interacting Protein 1*). MXI1 compite con MYC en la formación de los complejos MYC/MAX, siendo MAX (Factor X asociado a MYC; del inglés *Myc-Associated factor X*), un regulador positivo de la actividad transcripcional de MYC, que regula, entre otros, al propio gen de *Pgc1α*. Este mecanismo parece actuar también a nivel embrionario: los altos niveles de HIF1α en el modelo *Vhl/Nkx2.5* provocan un aumento en la expresión de *Mxi1* (Fig. 29B), que podría ser el responsable de la inhibición secundaria de *Pgc1α* y, por tanto, de una reducción en la biogénesis mitocondrial en este modelo. Además, la pérdida de *Hif1α* en el modelo *Hif1α/Nkx2.5* a E12.5 está acompañada de un descenso en la expresión de *Mxi1*, junto con un incremento en la expresión de *Pgc1α* (Fig. 54C), lo cual es también compatible con la hipótesis planteada. Este mecanismo de represión, por tanto, permitiría explicar tanto la reducción en el contenido mitocondrial del modelo *Vhl/Nkx2.5* como la adquisición precoz de mitocondrias en el modelo *Hif1α/Nkx2.5*.

Para el correcto establecimiento de una red mitocondrial funcional y activa no sólo son necesarios procesos de biogénesis mitocondrial. La dinámica mitocondrial también es un aspecto importante del proceso a nivel celular. La fusión mitocondrial, por la cual dos mitocondrias se convierten en una a través de la unión de sus membranas, permite el establecimiento de una red mitocondrial extensa, característica típica de células metabólicamente activas (Skulachev, 2001), además de promover la complementación entre mitocondrias dañadas (Nakada y cols., 2001). En cambio, la fisión mitocondrial permite la generación de nuevas mitocondrias (Youle y van der Bliek, 2012) y la eliminación de partes dañadas de la red mitocondrial (Twig y cols., 2008). Otro proceso fundamental de la dinámica

mitocondrial es la mitofagia, o proceso que permite la eliminación de mitocondrias dañadas para evitar, entre otras cosas, la activación de rutas apoptóticas (Lemasters, 2014). Si bien la adquisición de una red mitocondrial adelantada en el modelo *Hif1a/Nkx2.5* va acompañada de un ligero incremento en la expresión de genes relacionados con fusión mitocondrial, principalmente *Opa1*, así como de un descenso de expresión de los mediadores mitofágicos *Bnip3* y *Nix* (Figs. 54C,59) -dianas de HIF1- la pérdida de *Vhl* conlleva una expresión disminuida de los genes de fusión *Mfn1*, *Mfn2* y *Opa1* (Fig. 29B) y un aumento en los genes *Bnip3* y *Nix* (Fig. 30A). Si bien estudios previos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) muestran la existencia de sitios de unión para HIF1 en los promotores de *Mfn1* y *Opa1* (Guimaraes-Camboa y cols., 2015), no puede descartarse que el descenso observado en los niveles de estos genes en el mutante de *Vhl* sea consecuencia secundaria de una reducción en el número de mitocondrias, más que de un efecto transcripcional directo de HIF1. Por otra parte, el descenso en la expresión de *Mgarp*, gen inducido en hipoxia que codifica una proteína encargada del tráfico de mitocondrias a través de microtúbulos (Li y cols., 2009), también podría contribuir al agrupamiento mitocondrial y al fallo en el establecimiento de una red madura e interconectada en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 28A). Además, los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentan un incremento en la expresión de *Bnip3* y *Nix* (Fig. 30A), esenciales durante la activación de la mitofagia, que es operativa en estos mutantes en base a la detección de mitofagosomas en los análisis por MET (Fig. 30B). Estas alteraciones transcripcionales que favorecen la degradación de mitocondrias, junto con la inhibición de la biogénesis mitocondrial, también explican el reducido número de mitocondrias en este mutante y ponen de manifiesto el papel esencial de HIF1 como regulador del contenido y función mitocondrial en el miocardio embrionario.

Además de los efectos relacionados con biogénesis y dinámica mitocondrial, los resultados sugieren que la ruta de señalización de VHL/HIF1 juega un papel fundamental en la bioenergética celular. Por un lado, la activación mantenida de HIF1 en los mutantes deficientes en *Vhl* lleva asociada una acumulación de AG, tal y como sugiere la inhibición transcripcional de genes implicados en la incorporación y degradación de los mismos (Figs. 22B,26C), y como confirman los estudios metabólicos mediante RMN-¹H, que muestran un aumento de AG y un descenso en los niveles de citrato, un intermediario del Ciclo de Krebs. (Fig. 23). Es más, el análisis mediante MET demuestra que este incremento en la abundancia de AG se debe a su acumulación en forma de gotas lipídicas (Figs. 26A,B) por un bloqueo de su degradación, y no a un mayor flujo de los mismos en los procesos catabólicos. Por el contrario, la pérdida de *Hif1a* lleva asociada un incremento moderado en los niveles de expresión de estos genes sin existir acumulación de AG (Fig. 52). Este supuesto papel represor de HIF1 sobre el metabolismo de AG ha sido propuesto con anterioridad en contextos tumorales (Huang y cols., 2014), donde HIF1 media la inhibición de la expresión de los genes de diversas Acil-CoA deshidrogenasas de cadena media y larga. Por otra parte, la ruta del receptor activado por proliferación peroxisomal alfa/beta/delta (PPAR α / β / δ)

media el establecimiento de un metabolismo celular basado en oxidación de AG (Gilde y cols., 2003). Si bien se requiere un análisis del estado de activación de esta ruta en nuestros modelos de delección, la represión que HIF1 ejerce sobre la activación de PPAR al reducir su capacidad de unión al ADN (Belanger y cols., 2007), podría explicar, al menos en parte, el fenotipo observado. Este mismo mecanismo también se ha observado en otros contextos, como en células epiteliales sometidas a condiciones de hipoxia, donde HIF1 inhibe la activación de la ruta de esta ruta (Naravula y Colgan, 2001).

Por otro lado, el incremento en los niveles de HIF1 α observado en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* también provoca un descenso en la expresión de genes (*Ucp3*, *Ant1*, *CypD*, Fig. 29B) que codifican para componentes o reguladores del mPTP. Según un estudio previo de Hom y colaboradores (Hom y cols., 2011), el estado del mPTP juega un papel en la maduración de cardiomiocitos embrionarios. Así, la apertura del mPTP asociada a una expresión reducida de *CypD* y altos niveles de *ROS*, se correspondería con un fenotipo mitocondrial inmaduro presente a E9.5. En cambio, una mayor expresión de *CypD* se correlaciona con el cierre del poro y un descenso en los niveles de *ROS*, coincidente con un fenotipo mitocondrial más maduro detectable en cardiomiocitos a E13.5. Los autores proponen que esta maduración mitocondrial dirigida por el cierre del mPTP es fundamental para la completa maduración de los cardiomiocitos en esa ventana temporal del desarrollo. Las alteraciones descritas en nuestro modelo de delección de *Vhl* recuerdan al fenotipo inmaduro a E9.5 descrito por Hom y colaboradores. Es posible, por tanto, que nuestros datos se puedan integrar en este modelo y que la señalización mantenida de HIF1 pueda estar influenciando la maduración de los cardiomiocitos actuando a nivel de regulación de la apertura del mPTP. Esta conclusión también se ve reforzada por el hecho de que los mutantes *Vhl/Nkx2.5* presentan mayores niveles de *ROS* a E14.5 (Fig. 29C), compatibles con un fallo en el cierre del mPTP.

5 SEÑALIZACIÓN POR HIF1/VHL Y EL SISTEMA DE CONDUCCIÓN VENTRICULAR

La idea de que es necesario un descenso en los niveles de HIF1 α para la completa maduración del miocardio embrionario cobra más sentido al considerar las alteraciones observadas en el establecimiento del SC ventricular en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Figs. 34,35). Si bien la pérdida de *Hif1a* no parece afectar al patrón de expresión de genes fundamentales para la especificación del SC, como *Cx40*, *Tbx5* o *Nkx2.5* (Fig. 47), el incremento en los niveles de HIF1 α en las trabéculas tras la pérdida de *Vhl* sugiere que la señalización por VHL/HIF1 podría estar implicada en estos procesos (Fig. 35), así como en el control transcripcional de varios canales iónicos (*Kcne3*, *Kcnc3*, *Scn5a*, *Scn4b*, etc) relacionados con la propagación del impulso eléctrico y la contractilidad de los cardiomiocitos (Fig. 34B). Por otro lado, la hipoxia embrionaria ha sido recientemente vinculada a fallos eléctricos cardíacos asociados al Síndrome de Muerte Súbita Infantil (Neary y cols., 2013), lo que demuestra la existencia de conexiones previas entre el eje VHL/HIF y la homeostasis del SC. Es más, mutaciones en *Scn5a* o *Tbx5*, que muestran

expresión alterada en nuestro modelo de pérdida de *Vhl*, están implicadas en el desarrollo de patologías cardíacas congénitas, como el Síndrome del QT largo y el Síndrome de Brugada (*Scn5a*) (Kimura y cols., 2016; Velthmann y cols., 2016) así como el Síndrome de Holt-Oram (*Tbx5*) (Koçak Eker y cols., 2016; Mori y Bruneau, 2004).

El descenso observado en la expresión de estos marcadores en los mutantes deficientes en *Vhl* plantea un papel represor de HIF1 sobre los mismos (Figs. 34,35). Este hecho aporta más información a nuestro modelo, según el cual es necesario el descenso en los niveles de HIF1 α : considerando este efecto inhibitorio sobre el programa genético del SC ventricular, la ausencia de HIF1 α en las trabéculas, principales estructuras de las que deriva el SC, es necesaria para el correcto establecimiento del mismo. Por otro lado, la presencia de HIF1 α en el MC hasta E14.5 también podría evitar localmente la adquisición de un fenotipo conductor en esa zona, permitiendo la maduración de los cardiomiocitos del MC a un fenotipo contráctil no conductor. Por otra parte, este efecto inhibitorio de HIF1 en la especificación del SC parece ser específico del SC ventricular, ya que no se han detectado alteraciones en la especificación de otros componentes esenciales del SC cardíaco, como el nodo sinoatrial, marcado por la expresión del canal de potasio *Hcn4* (Fig. 35D). Es más, si bien la delección de *Vhl* afecta a la especificación del SC ventricular, este efecto no parece ser debido a un fallo en la especificación de las propias trabéculas, al no haber cambios significativos en su distribución o número (Fig. 12D) ni diferencias en el patrón de expresión de marcadores trabeculares, como *Anf* (Fig. 35C).

Nuevamente, la represión transcripcional parece contradecir, *a priori*, la función de HIF1 como factor de transcripción. Sin embargo, se han descrito previamente escenarios en los que HIF1 puede influir negativamente en la regulación transcripcional de algunos genes. Por ejemplo, HIF1 puede unirse a SP1, desplazando a c-MYC del complejo SP1/c-MYC y disminuir así su actividad, como en el caso de la regulación de *p21* (Gordan y cols., 2007). Además, HIF1 α media la transcripción de co-represores transcripcionales, como el co-represor 2 de REST (*Rorc-2*, del inglés *REST co-repressor 2*), descrito previamente como un mediador de inhibición transcripcional en hipoxia (Ortiz-Barahona y cols., 2010). Esta hipótesis, junto con la mencionada anteriormente sobre *Mxi1*, se ve apoyada por el hecho de que en el modelo *Vhl/Nkx2.5* se observe un incremento transcripcional de *Rorc-2*, *p21* y *Mxi1*. Además, como se ha comentado anteriormente, la inducción de diversos microARNs por HIF1 también podría explicar su acción inhibitoria sobre el establecimiento del SC, además de abrir nuevas líneas de investigación sobre el papel de los hipoxamiRs en procesos de desarrollo, diferenciación y maduración cardíaca.

En esta línea, si bien la pérdida de *Hif1a* no causa alteraciones evidentes en el SC, la señalización mantenida y extendida a las trabéculas en el mutante *Vhl/Nkx2.5* sí provoca una inhibición transcripcional tanto de *Cx40*, como de *Tbx5* y *Nkx2.5* (Figs. 35A,B). A pesar de que es conocido que

tanto NKX2.5 como TBX5 actúan como reguladores transcripcionales de *Cx40* (Moskowitz y cols., 2007, 2004), las señales reguladoras anteriores no están completamente establecidas. En este sentido, nuestros resultados sugieren un papel fundamental de HIF1 en la regulación de esta red transcripcional. Esto se ve reforzado por diversos hallazgos previos que vinculan HIF1 con estos factores. Por un lado, la descripción previa de HIF1 como regulador del promotor de *Nkx2.5* en *Xenopus laevis* (Nagao y cols., 2008) se ha confirmado por estudios recientes de ChIPSeq en tejido cardíaco embrionario de ratón (Guimaraes-Camboa y cols., 2015). Además, si bien no se ha confirmado interacción directa mediante ChIPSeq, *Tbx5* también se ha descrito como un gen diana de HIF1 en corazón a E10.0 (Krishnan y cols., 2008). Por otro lado, el mismo estudio de ChIPSeq propone que *Cx40* pueda estar regulada a nivel transcripcional por HIF1, como también sugieren nuestros resultados de expresión reducida en el mutante *Vhl/Nkx2.5*, apuntando nuevamente a una contribución de HIF1 a la especificación del SC a través de la regulación directa de genes esenciales en la transmisión del impulso eléctrico cardíaco.

Sin embargo, existe cierta contradicción entre nuestros resultados y estudios previos, como el hecho de que el incremento en HIF1 α en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* provoque una disminución en la expresión de *Tbx5*, frente al efecto positivo sobre su transcripción descrito previamente en corazones deficientes en *Hif1a* a E10.0 (Krishnan y cols., 2008). No obstante, el distinto estadio de análisis o la posible existencia de distintos programas genéticos en el MC y en las trabéculas, podría justificar estas discrepancias. Por otro lado, la función cardíaca impedida en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Fig. 32), así como la existencia de áreas hipoquinéticas en estos corazones, sugiere unos defectos conductivos en concordancia con el fenotipo neonatal arritmogénico previamente descrito en los mutantes *Vhl/aMHCCre* (Neary y cols., 2013) así como en los mutantes cardíacos condicionales de *Phd2* y *Phd3* (Minamishima y cols., 2008; Moslehi y cols., 2010).

Además, tampoco se puede descartar que las alteraciones metabólicas consecuencia de la alterada señalización mediada por VHL/HIF1 puedan jugar un papel directo en la regulación de estos procesos. En múltiples contextos se ha descrito que el metabolismo influye *per se* en la regulación de la expresión génica y el control de diversos procesos, como por ejemplo, la regulación del comportamiento de las células endoteliales (De Bock y cols., 2013) o la modulación de la acetilación de histonas por los niveles celulares de acetil-CoA (Bulusu y Aulehla, 2016). Si bien es necesario profundizar en las conexiones entre el estado metabólico del cardiomiocito y la regulación de estos procesos, nuestros resultados sugieren la existencia de conexiones entre la señalización por HIF1, el metabolismo cardíaco y el establecimiento del SC que pueden ser de potencial interés en el estudio de enfermedades cardíacas congénitas, especialmente aquellas relacionadas con defectos metabólicos y fallos en la conducción.

6 FUNCIONES DE VHL INDEPENDIENTES DE HIF1 α Y PAPEL DE HIF2 α

El empleo del modelo doble mutante *Hif1 α /Vhl/Nkx2.5* es fundamental para tratar de determinar qué parte del fenotipo de los mutantes *Vhl/Nkx2.5* es debido a la señalización mantenida de HIF1 y qué parte es debida a la pérdida de *Vhl per se*. La combinación de los tres modelos genéticos, de pérdida de *Vhl*, *Hif1 α* o simultáneamente de ambos genes, nos ha permitido acotar qué alteraciones fenotípicas son atribuibles a HIF1 y cuáles no. Tanto el incremento glucolítico observado, como la inhibición del establecimiento de una red mitocondrial madura estarían causados por el incremento en HIF1 α y no por la pérdida de *Vhl*, al observarse inhibición glucolítica (Figs. 25B,C,D), aparición mitocondrial adelantada a E12.5 (Figs. 55C,D), sin alteraciones a E14.5 (Fig. 31), y un metabolismo lipídico normal (Fig. 27) en el doble mutante. Así mismo, las alteraciones en función cardíaca y adelgazamiento del MC presentes tras la delección de *Vhl* a E14.5 estarían causadas por la expresión ectópica de HIF1 α , al verse rescatadas en el modelo de doble delección (Figs. 14,33). Por otro lado, la exposición de hembras gestantes a hipoxia (10% O₂) durante 48 horas resulta en un fenotipo cardíaco similar y la misma distribución alterada de GLUT1 que en los mutantes *Vhl/Nkx2.5* (Figs. 13, 25A), apoyando la conclusión de que esos defectos son debidos a una señalización incrementada por factores HIF.

Curiosamente, al margen de la recuperación de unas dimensiones del MC normales, en el modelo doble mutante no se consigue un rescate de la letalidad embrionaria tras la pérdida de *Vhl* y el rescate en los niveles de expresión de *Cx40* es sólo parcial (Fig. 36). Por otra parte, el modelo *Hif1 α /Nkx2.5* no presenta letalidad embrionaria ni postnatal, y tampoco muestra alteraciones morfológicas (Fig. 41,60) ni en el establecimiento del SC (Fig. 47) a E14.5, además de presentar una función cardíaca normal en la etapa adulta en condiciones basales (Figs. 61,62). Ambas observaciones soportan la conclusión de que las alteraciones no rescatadas en el modelo de doble delección puedan ser debidas a funciones de VHL no relacionadas con la regulación de HIF1, como se ha mencionado anteriormente.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que VHL también regula a la isoforma HIF2 α . En relación a esta isoforma de HIF, resultados preliminares de nuestro laboratorio, no mostrados en esta Tesis Doctoral, apuntan a que, durante el desarrollo cardíaco, HIF2 α se expresa a bajos niveles en el endocardio y parte del epicardio, pero no en el miocardio. Ante la pérdida de *Hif1 α* podría tener lugar una regulación positiva de *Hif2 α* , que permita compensar la pérdida de actividad de HIF1 y garantizar un correcto desarrollo cardíaco. Sin embargo, en el caso del doble mutante, donde la pérdida de *Hif1 α* es simultánea a la delección de *Vhl*, la activación de HIF2 sería mucho mayor que en el caso del mutante *Hif1 α /Nkx2.5*. De este modo, la sobreactivación de HIF2 en el doble mutante podría tener efectos deletéreos en etapas tardías de la gestación. Es más, dada la contribución del linaje de NKX2.5 al endocardio y al epicardio, estructuras con expresión de HIF2 α , los defectos vasculares y valvulares observados en el doble mutante podrían ser debidos a un incremento en la señalización por HIF2 en

estas estructuras. Por ejemplo, c-MYC y el receptor tirosina quinasa TIE2, ambos reguladores de la proliferación celular, están regulados por HIF2 y se ha descrito su expresión en las válvulas embrionarias (Jaffredo y cols., 1989; Lincoln y cols., 2004). Por otro lado, el factor de transcripción *Twist1*, que coopera con *Snail* para promover procesos de EMT, también es una diana de HIF2 (Gort y cols., 2008). Así, una hipotética activación de HIF2 en el endocardio valvular podría desencadenar un mayor grado de TEM por sobreexpresión de *Twist1* y *Snail*, lo que podría contribuir al fenotipo de hipertrofia valvular observado en los mutantes *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*. Además, el aumento en HIF2 α también está asociado a un incremento en la expresión del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A (*Vegfa*, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Miquerol y cols., 2000), lo que podría estar relacionado con las alteraciones coronarias descritas en el doble mutante y mutante simple de *Vhl*.

Estas observaciones abren una interesante línea de investigación sobre el papel de HIF2 tan poco estudiado durante el desarrollo cardiaco, especialmente en el endocardio y sus procesos relacionados, como la formación de la vasculatura coronaria, el desarrollo de las válvulas y la trabeculación. Así, tanto el modelo de doble delección, como nuevos modelos de delección de *Hif2a* mediante el empleo de diversas Cre, como *Nkx2.5-Cre* o *TnTc-Cre* (cardiomiocitos) o *Nfatc1-Cre* (endocardio), supondrían unas herramientas idóneas para estos estudios en el futuro.

Por otro lado, además de la regulación de los factores HIF, VHL se ha descrito como regulador de múltiples funciones celulares de manera independiente de HIF, como senescencia (Young y cols., 2008), apoptosis (Guo y cols., 2009), estabilidad de microtúbulos (Hergovich y cols., 2003) y regulación de la matriz extracelular (Ohh y cols., 1998), entre otras. Estas funciones podrían jugar un papel importante durante etapas finales del desarrollo, contribuyendo también a los defectos valvulares, del SIV y/o del desarrollo coronario en los dobles mutantes a E17.5 (Fig. 37,38). Por ejemplo, un estudio previo de Tang y colaboradores demuestra el papel esencial de *Vhl* en células endoteliales por su papel en la regulación del ensamblaje de la fibronectina (Tang y cols., 2006), la cual forma parte de la matriz extracelular de los cojines endocárdicos (Bouchey y cols., 1996). Puesto que el remodelado de la matriz extracelular es un proceso fundamental en las etapas finales del desarrollo de las válvulas cardíacas, estas observaciones apoyan la hipótesis de un papel de VHL en los procesos de valvulogénesis. Por todo ello, una mayor caracterización del modelo *Hif1a/Vhl/Nkx2.5*, incluyendo estudios masivos del perfil transcripcional, podría proporcionar información novedosa sobre nuevas funciones de VHL durante la cardiogénesis y la maduración del corazón en etapas cercanas al nacimiento, además de aportar nueva información sobre el papel de HIF2 en estos procesos.

7 ADAPTACIONES METABÓLICAS TRAS LA PÉRDIDA DE HIF1 α

Si bien los resultados mostrados en esta tesis demuestran claramente los efectos negativos de una señalización de HIF1 mantenida en el tiempo y extendida a las trabéculas, resulta curioso que la pérdida de *Hif1a* no tenga, aparentemente, mayores consecuencias ni para el desarrollo cardíaco (Fig. 41) ni para la posterior etapa adulta. La adquisición adelantada de una red mitocondrial madura a E12.5 (Figs. 53,54,55A,B), junto con la inhibición de la vía glucolítica observada en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 49,50), sugiere la existencia de mecanismos compensatorios adaptativos a nivel metabólico que permiten al corazón embrionario continuar con el proceso de desarrollo sin mayores consecuencias. Por una parte, el incremento en el número de mitocondrias a E12.5 en estos mutantes está claramente justificado por la pérdida de los mecanismos de represión transcripcional mediados por HIF1 descritos anteriormente. Como se ha mencionado antes, la disponibilidad de AG en la sangre fetal en torno a E12.5 es bastante limitada (Lopaschuk y Jaswal, 2010), por lo que, en principio, la oxidación de AG no podría sustentar la demanda energética celular a este estadio. Sin embargo, estos mutantes presentan una respuesta adaptativa consistente en el incremento transcripcional de genes involucrados en la incorporación y degradación de aminoácidos (Figs. 48,56A,B). En este sentido, los resultados del análisis metabolómico mediante RMN-¹H (Figs. 57) no permiten extraer conclusiones claras, debido en parte a que el análisis de corazones embrionarios aislados mediante esta técnica no aporta resolución suficiente para la cuantificación de aminoácidos individuales. Por ello, hemos planteado un abordaje experimental con mayor sensibilidad, como el proporcionado por la técnica de Espectrometría de Masas, que está en proceso, para tratar de determinar con mayor resolución alteraciones en las rutas degradativas de ciertos aminoácidos. Por otra parte, estas adaptaciones metabólicas no parecen alterar el comportamiento del MC, como demuestra la ausencia de diferencias en la expresión de *Mycn* (Fig. 43), un marcador de identidad del MC.

Pese a su baja resolución en este modelo, mediante RMN-¹H se han identificado ciertas alteraciones, si bien su interpretación no es tan inmediata como en el modelo de ganancia de función por delección de *Vhl*. Por un lado, resulta llamativo que, ante una situación de glucolisis inhibida, no se observe un descenso significativo en los niveles de lactato. Sin embargo, en situaciones donde la glucolisis está dirigida a la producción de intermediarios de biosíntesis para favorecer proliferación celular, los niveles de lactato producidos no llegan a elevarse hasta los alcanzados en una glucolisis orientada a la generación de ATP (Ryan y cols., 2015). Por tanto, en condiciones basales (embriones control) la producción de lactato sería limitada, ya que el programa glucolítico del MC está asociado a la proliferación de esta capa. Esta situación de partida en el control, podría explicar en parte la ausencia de bajada en los niveles de lactato en el caso del mutante de *Hif1a*, pese al bloqueo sustancial de la glucolisis. Por otro lado, debido a que la producción de lactato depende de los niveles y del destino del

piruvato, no siempre puede establecerse una correlación entre flujo glucolítico y abundancia de lactato (Ryan y cols., 2015). También se observa un incremento en los niveles de glutamina en el mutante *Hif1a/Nkx2.5*. La glutamina puede transformarse, a través de diversas reacciones enzimáticas, en citrato, oxalacetato o malato. Estos metabolitos pueden incorporarse al Ciclo de Krebs, pero también pueden sufrir otras reacciones que tienen como producto final lactato: el citrato puede transformarse en oxalacetato y éste, a su vez, ser transformado en fosfoenolpiruvato o reaccionar con el malato para, en ambos casos, generar piruvato, el cual puede ser convertido en lactato. También se observan mayores niveles de AG en los mutantes *Hif1a/Nkx2.5*. Este resultado, sin estar asociado a la detección de gotas lipídicas mediante MET (Fig. 52B,C), puede parecer contradictorio, al ser análogo al obtenido para el modelo de pérdida de *Vhl* (Fig. 23), donde el incremento era debido a la acumulación intracelular de los mismos. Sin embargo, hay que recordar que esta técnica, en ausencia de marcaje isotópico, ofrece una instantánea del estado metabólico celular, pero no aporta información sobre los flujos metabólicos. Así, la mayor abundancia de AG en ausencia de su acumulación en forma de gotas lipídicas podría ser debida a un mayor flujo a través del metabolismo mitocondrial, justificado por el mayor número de mitocondrias presente en los mutantes deficientes en *Hif1a* a E12.5 (Fig. 55), así como por el hecho de que la expresión de *Crat* y *Lpl*, implicados en incorporación y transporte de AG se encuentra incrementada (Fig. 52A). Esta hipótesis también está en acuerdo con el ciclo de Randle, según el cual existe una competición entre el metabolismo glucolítico y la degradación de AG (Randle y cols., 1963). Así, ante una situación de inhibición glucolítica, un mayor aporte de AG apuntaría a una mayor degradación mitocondrial de los mismos.

Por otra parte, si bien no se observan procesos de mitofagia en el modelo *Hif1a/Nkx2.5* (Fig. 59), existe un incremento transcripcional significativo de *p62* en estos corazones embrionarios. P62 es una proteína de reconocimiento del cargo implicada en la degradación autofágica de proteínas celulares con el objetivo de reciclar sus componentes aminoacídicos (Lim y cols., 2015). Puesto que en estas etapas centrales de la gestación la renovación de proteínas, especialmente factores de transcripción, es muy rápida y elevada (Merz y cols., 1981), su degradación mediante mecanismos dependientes de P62, por un redireccionamiento del flujo autofágico, supondría una vía adicional de obtención de aminoácidos para sustentar el metabolismo celular hasta el establecimiento de un sistema maduro de degradación de AG. Esta hipótesis sobre el uso catabólico de los aminoácidos también se ve apoyada por el hecho de que la ruta de mTOR, dirigida a un incremento en la síntesis proteica en respuesta al aumento en la disponibilidad de aminoácidos (Morita y cols., 2015; Wang y Proud, 2006), no se encuentra activa, a nivel de la fosforilación de E4BP-1, e incluso inhibida a nivel de la fosforilación de S6K (Fig. 58). Si bien son necesarios estudios de la activación de la vía de AMPK, que activaría, entre otros procesos, el uso de los aminoácidos como fuente energética (Gwinn y cols., 2008; Horman y cols., 2002), los resultados descritos apuntan al uso de aminoácidos como fuente de energía, por su capacidad anaplerótica de

proveer intermediarios del Ciclo de Krebs, ante la inhibición glucolítica causada por la pérdida de *Hif1α*. Esta hipótesis se ve reforzada por el incremento transcripcional observado a E12.5 en genes codificantes de transportadores de aminoácidos y enzimas catabólicas de los mismos (Fig. 56).

Finalmente, no puede descartarse una compensación por HIF2 ante la pérdida de *Hif1α*, si bien es cierto que esta compensación, de tener lugar, no sería completa, ya que no existe un solapamiento total entre los genes diana de ambas isoformas (Hu y cols., 2003). Por ejemplo, los genes glucolíticos están regulados por HIF1, pero no por HIF2α. Resultados preliminares no mostrados en esta Tesis Doctoral apuntan a que tal compensación no tiene lugar en etapas embrionarias, estando HIF2 expresado principalmente en células del endocardio y parte del epicardio. Además, no hemos observado un aumento en los niveles de ARNm de *Hif2α* en corazones de embriones deficientes en *Hif1α*, lo cual apunta a que, al menos a nivel transcripcional, no parece haber mecanismos de compensación por inducción de *Hif2α* en cardiomiocitos. Sin embargo, son necesarios más experimentos, incluyendo análisis de los niveles de proteína de HIF2α o la generación de un doble mutante *Hif1α/Hif2α* para dar una respuesta definitiva a esta cuestión.

Otro aspecto interesante es la aparente ausencia de fenotipo cardíaco en los mutantes *Hif1α/Nkx2.5* en la etapa adulta (Figs. 60,61,62). Por un lado, en condiciones basales, no resulta sorprendente. Si las adaptaciones metabólicas anteriores a E12.5 son suficientes, como sugiere el normal desarrollo de estos embriones, para garantizar el correcto desarrollo del corazón, una vez establecido el catabolismo de AG, el hecho de contar con una inhibición glucolítica no debería ser perjudicial para estos animales. Sin embargo, se ha descrito un importante papel de HIF1 durante procesos patológicos o en respuesta a situaciones de estrés cardíaco como sobrecarga por presión mediante constricción de la aorta torácica o ante un proceso isquémico provocado por un infarto de miocardio (Kido y cols., 2005; Nakada y cols., 2016; Semenza, 2014; Wei y cols., 2012). Un aspecto muy interesante a estudiar en el futuro, que podría aportar más información acerca del papel de HIF1 en estos procesos, es analizar la respuesta del modelo *Hif1α/Nkx2.5* en la etapa adulta ante estas situaciones de estrés cardíaco para determinar la importancia de una reprogramación metabólica en condiciones de isquemia en el miocardio adulto y determinar el papel de HIF1 en la regulación bioenergética cardíaca con fines adaptativos.

8 MODELO PROPUESTO

En conjunto, los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral permiten establecer un modelo de expresión dinámico de HIF1α durante el desarrollo cardíaco (Fig. 64). Según este modelo, la presencia de HIF1α en el MC permite establecer un metabolismo glucolítico esta región, a la vez que reprimiría la expresión de genes relacionados con un fenotipo conductivo. Por el contrario, la ausencia de HIF1α en las trabéculas favorece un enriquecimiento en el contenido y actividad mitocondrial en esta zona,

además de permitir la expresión de un programa genético esencial para la especificación del SC ventricular. Además, el descenso en los niveles de HIF1 α en torno a E14.5 en el MC es necesario para la formación de una red mitocondrial madura y para favorecer un cambio metabólico de glucólisis a oxidación de AG. Por otro lado, la señalización de HIF1 no parece ser imprescindible en el MC, ya que su pérdida es compatible con el desarrollo cardíaco y la viabilidad y conlleva adaptaciones metabólicas basadas en el uso de aminoácidos como sustrato energético hasta el establecimiento del catabolismo de AG en etapas posteriores. En resumen, este modelo establece el papel fundamental de HIF1 como regulador del metabolismo cardíaco embrionario y, bien a través de su control metabólico o por mecanismo independientes, en la especificación del SC ventricular. Nuestro trabajo además plantea la existencia de posibles nuevas funciones de HIF2 y de VHL durante el desarrollo cardíaco y abre nuevos horizontes para explorar la importancia de la señalización de VHL/HIFs en la regulación bioenergética en contextos de patología adulta.

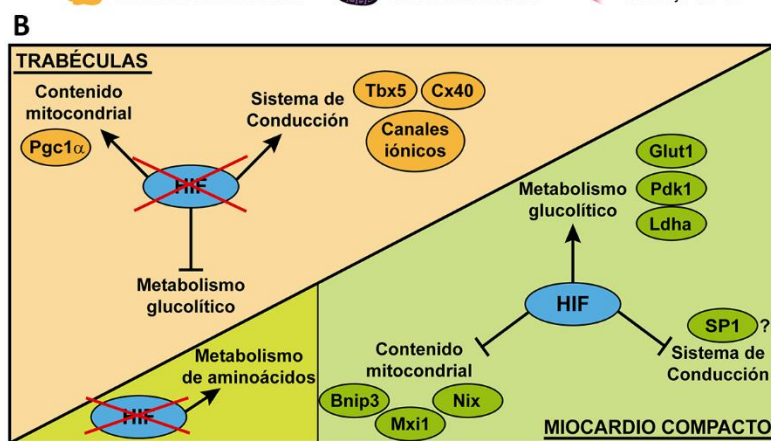
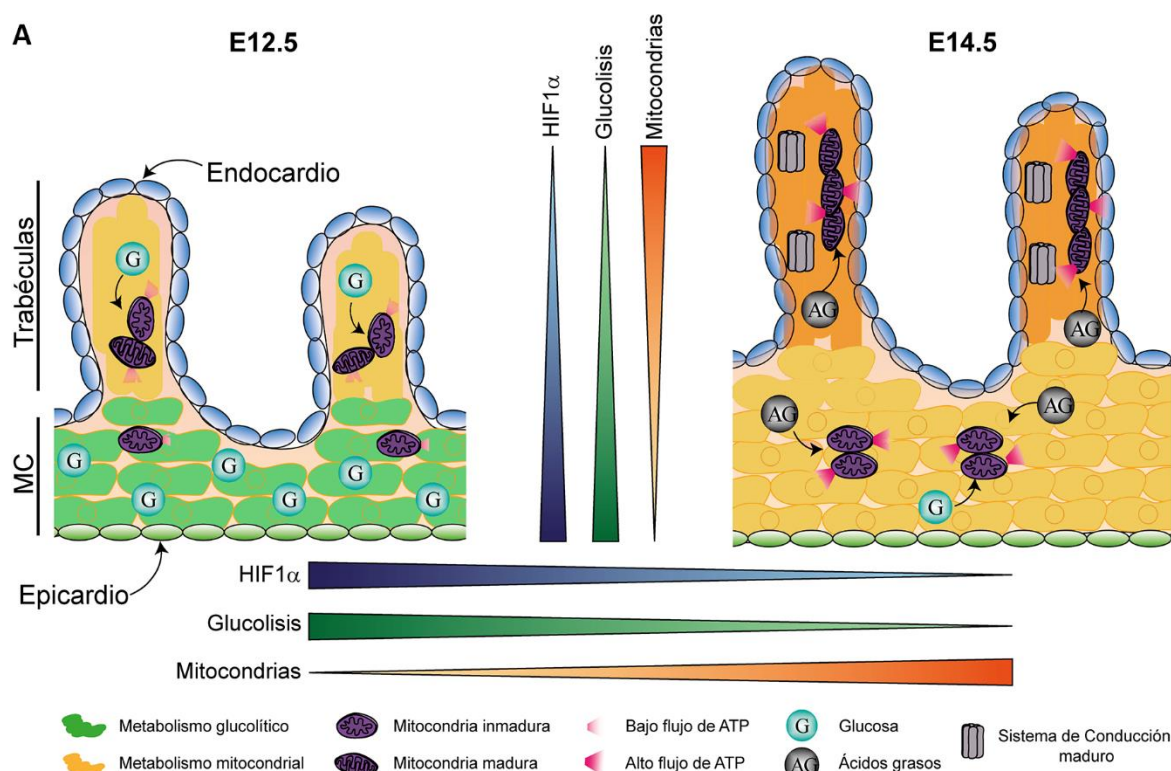


Figura 64 – Modelo propuesto del papel de HIF1α en el corazón en desarrollo

A) El modelo representa el miocardio embrionario a E12.5 (izquierda) y E14.5 (derecha). A E12.5 el MC es principalmente glucolítico (G) mientras que las trabéculas presentan un metabolismo más oxidativo, si bien la red mitocondrial todavía no está madura. A E14.5 el MC depende menos de la glucólisis como fuente de energía, empezando a depender del

metabolismo mitocondrial. Las trabéculas presentan un marcado metabolismo oxidativo de ácidos grasos (AG), con una red mitocondrial madura y activa. Los triángulos representan el gradiente temporal (horizontal) y espacial (vertical) para HIF1α (azul), el metabolismo glucolítico (verde) y el metabolismo mitocondrial (naranja). Mayor intensidad del color indica mayores niveles, mientras que intensidades más claras indican menores niveles. B) El esquema muestra el papel de HIF1α en el MC (verde) y en las trabéculas (naranja). En el MC HIF1α establece un metabolismo glucolítico (*Glut1*, *Pdk1*, *Ldha*), inhibe el incremento del contenido mitocondrial por activación de la mitofagia (*Bnip3* y *Nix*) y por la expresión de inhibidores transcripcionales, como *Mxi1*. También inhibe la aparición de un fenotipo conductivo, probablemente por el incremento de inhibidores transcripcionales como *Sp1*. En las trabéculas, la ausencia de HIF1α permite el establecimiento de una red mitocondrial activa, al permitirse la expresión, entre otros, de *Pgc1α*, además de activarse la expresión de genes del SC (*Tbx5*, *Cx40* y canales iónicos). Por último, en ausencia de HIF1α en el MC (verde, abajo a la izquierda) se establece un metabolismo adaptativo basado en la degradación de aminoácidos.

CONCLUSIONES

- 1) La distribución de HIF1 α en el corazón embrionario está regulada tanto a nivel temporal como espacial, presentando un descenso paulatino de sus niveles a medida que progresa la cardiogénesis entre E9.5 y E14.5, así como un patrón heterogéneo coincidente con las regiones anatómicas del corazón en desarrollo, con altos niveles de HIF1 α en el miocardio compacto y una exclusión de su expresión en las trabéculas a estadios de gestación intermedios (E12.5).
- 2) Las cámaras ventriculares embrionarias presentan compartimentos metabólicos bien diferenciados en sus dos regiones anatómicas, con un programa glucolítico activo en el miocardio compacto frente a un mayor contenido y actividad mitocondrial en las trabéculas.
- 3) La programación metabólica de las cámaras ventriculares en desarrollo está sujeta a una regulación temporal, con una reducción paulatina del metabolismo glucolítico y un aumento progresivo del contenido y actividad mitocondrial en el miocardio compacto, dando lugar a un cambio o “shift” metabólico coincidente con la disminución gradual en los niveles de HIF1 α .
- 4) La distribución heterogénea de HIF1, y su señalización positiva en el miocardio compacto hasta E12.5, es responsable del establecimiento de los compartimentos metabólicos en las cámaras ventriculares embrionarias. Además, la reducción en los niveles de HIF1 α permite el cambio metabólico que opera entre E12.5 y E14.5, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos.
- 5) La activación mantenida de la señalización de HIF1 en el miocardio compacto, tras la delección de su regulador negativo *Vhl*, destruye los compartimentos metabólicos del miocardio en desarrollo y resulta en activación permanente de la ruta glucolítica, reducción dramática de la red y actividad mitocondrial y defectos de contractilidad, asociados a un severo adelgazamiento del miocardio compacto, disfunción cardíaca y letalidad embrionaria.
- 6) HIF1 ejerce un papel inhibitorio sobre distintos genes implicados en conducción y contracción y su ausencia en las trabéculas permite el establecimiento del programa genético responsable del correcto desarrollo del Sistema de Conducción ventricular.
- 7) HIF1 regula el estado metabólico, la maduración y función cardíaca a nivel de cardiomiocito de manera autónoma de célula, aunque la pérdida de *Vhl* en el linaje NKX2.5 resulta en alteraciones vasculares independientes de HIF1 a nivel de epicardio o endocardio.

- 8) Además de su efecto regulador sobre los niveles de HIF1 α , la proteína VHL desempeña funciones esenciales durante el desarrollo cardíaco y su pérdida en el linaje de NKX2.5 resulta en letalidad en etapas perinatales asociada a defectos valvulares y del septo interventricular.
- 9) A pesar de la fina regulación de su distribución espacial y temporal en las cámaras ventriculares embrionarias, la presencia de HIF1 α es prescindible para la correcta formación, maduración o función cardíaca y su ausencia pone en marcha mecanismos compensatorios compatibles con la viabilidad de ratones deficientes para *Hif1a*, incluyendo la activación del catabolismo de aminoácidos.
- 10) Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto el papel inhibitorio de HIF1 sobre diferentes genes que controlan procesos biológicos esenciales en el desarrollo cardíaco, desde la biogénesis mitocondrial hasta la formación del Sistema de Conducción ventricular, planteando la existencia de vías de regulación negativa dependientes de HIF1 y abriendo nuevas perspectivas para la identificación de microARNs o represores transcripcionales regulados por HIF con relevancia fisiológica.

CONCLUSIONS

- 1) HIF1 α distribution within the embryonic heart is regulated both at temporal and spatial level, showing a progressive decrease in its levels as cardiogenesis progress between E9.5 and E14.5, as well as a heterogeneous pattern coincident with the embryonic heart anatomic regions, with high HIF1 α levels in the compact myocardium and its absence in the trabeculae by midgestation (E12.5).
- 2) Embryonic ventricular chambers display well established metabolic compartments by the anatomic regions, with active glycolytic program in the compact myocardium opposite to higher mitochondrial content and activity in the trabeculae.
- 3) The metabolic programming of the developing ventricular chambers is subject to a temporal regulation, with a gradual reduction of the glycolytic metabolism and a progressive increase in mitochondrial content and activity in the compact myocardium, resulting in a metabolic switch that happens together with the gradual decrease in HIF1 α levels.
- 4) HIF1 heterogeneous distribution and signaling in the compact myocardium up to E12.5 is responsible for the establishment of the metabolic compartments in the embryonic ventricular chambers. Also, HIF1 α levels drop allows the metabolic switch that takes place between E12.5 and E14.5, stimulating fatty acid oxidation.
- 5) HIF1 sustained signaling in the compact myocardium upon deletion of its negative regulator *Vhl* destroys the metabolic compartments of the developing myocardium and causes permanent activation of the glycolytic pathway, dramatic reduction of the mitochondrial network and activity and contractility defects, together with severe compact myocardium thinning, cardiac dysfunction and embryonic lethality.
- 6) HIF1 plays an inhibitory role over several genes involved in conduction and contractility and its absence in the trabeculae allows the establishment of the genetic program controlling proper development of the ventricular conduction system.
- 7) HIF1 regulates the metabolic status, the maturation and the cardiac function in cardiomyocytes in a cell-autonomous manner, even though *Vhl* loss in *Nkx2.5* lineage results in HIF1-independent vascular alterations in the epicardium or the endocardium.
- 8) In addition to its regulatory effects on HIF1 α , VHL protein plays essential functions during cardiac development and its loss in *Nkx2.5* lineage results in perinatal lethality associated to valve and interventricular septum defects.

- 9) Despite of the fine regulation of HIF1 α spatial and temporal distribution in the ventricular chambers, the presence of HIF1 α is dispensable for proper cardiac development, maturation or function and its loss initiates compensatory mechanisms compatible with the viability of *Hif1 α* -deficient mice, including aminoacid catabolism activation.
- 10) The results of this Thesis demonstrate the inhibitory role of HIF1 on different genes that control distinct biological processes essential for cardiac development, from mitochondrial biogenesis to ventricular conduction system formation, suggesting the existence of negative HIF1-dependent regulatory pathways and opening new perspectives for the identification of microRNAs or transcriptional repressors regulated by HIF1 with physiological relevance.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, A., Baek, S.T., Huang, G., Eskiocak, B., Goetsch, S., Sung, C.Y., Banfi, S., Sauer, M.F., Olsen, G.S., Duffield, J.S., Olson, E.N., Tallquist, M.D., 2012. The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development* 139, 2139–2149.
- Adelman, D.M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M.C., Maltepe, E., 2000. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 14, 3191–3203.
- Aitola, M.H., Pelto-Huikko, M.T., 2003. Expression of Arnt and Arnt2 mRNA in developing murine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 41–54.
- Allemann, Y., Rotter, M., Hutter, D., Lipp, E., Sartori, C., Scherrer, U., Seiler, C., 2004. Impact of acute hypoxic pulmonary hypertension on LV diastolic function in healthy mountaineers at high altitude. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*
- Andrews, S., 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [WWW Document]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ang, S.O., Chen, H., Hirota, K., Gordeuk, V.R., Jelinek, J., Guan, Y., Liu, E., Sergueeva, A.I., Miasnikova, G.Y., Mole, D., Maxwell, P.H., Stockton, D.W., Semenza, G.L., Prchal, J.T., 2002. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat. Genet.* 32, 614–621.
- Aoi, W., Naito, Y., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Ichikawa, H., Yoshikawa, T., 2010. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E799–806.
- Appelhoffl, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M., 2004. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279, 38458–38465.
- Azzouzi, H. el, Leptidis, S., Doevendans, P.A., De Windt, L.J., 2015. HypoxamiRs: Regulators of cardiac hypoxia and energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*
- Baek, J.H., Mahon, P.C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Semenza, G.L., 2005. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol. Cell* 17, 503–512.
- Belanger, A.J., Luo, Z., Vincent, K.A., Akita, G.Y., Cheng, S.H., Gregory, R.J., Jiang, C., 2007. Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-induced cardiomyocyte lipid accumulation by reducing the DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor α /retinoid X receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 567–572.
- Berchner-Pfannschmidt, U., Tug, S., Kirsch, M., Fandrey, J., 2010. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell. Signal.*
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J., 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082–4090.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., Simon, M.C., 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967–75.
- Beyer, S., Kelly, R.G., Miquerol, L., 2011. Inducible Cx40-Cre expression in the cardiac conduction system and arterial endothelial cells. *Genesis* 49, 83–91.
- Bing, R.J., Siegel, A., Ungar, I., Gilbert, M., 1954. Metabolism of the human heart: II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* 16, 504–515.
- Blausen, B.E., Johannes, R.S., Hutchins, G.M., 1990. Computer-based reconstructions of the cardiac ventricles of human embryos. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 3, 37–43.
- Bolotin, G., Raman, J., Williams, U., Bacha, E., Kocherginsky, M., Jeevanandam, V., 2007. Glutamine improves myocardial function following ischemia-reperfusion injury. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.* 15, 463–467.
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., Blanpain, C., 2008. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* 3, 69–84.
- Bonen, A., 2001. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86, 6–11.
- Bonnefont, J.P., Demaugre, F., Prip-Buus, C., Saudubray, J.M., Brivet, M., Abadi, N., Thuillier, L., 1999. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* 68, 424–440.
- Bouchey, D., Argraves, W.S., Little, C.D., 1996. Fibulin-1, vitronectin, and fibronectin expression during avian cardiac valve and septa development. *Anat. Rec.* 244, 540–551.
- Brade, T., Pane, L.S., Moretti, A., Chien, K.R., Laugwitz, K.-L., 2013. Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a013847–a013847.
- Brown, C.B., Baldwin, H.S., 2006. Neural crest contribution to the cardiovascular system. *Adv. Exp. Med. Biol.*
- Bruick, R.K., McKnight, S.L., 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* (80-.). 294, 1337–1340.
- Bruneau, B.G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C.J., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 1999. Chamber-specific

- cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 211, 100–108.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S., 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* 6, 826–837.
- Bulusu, V., Aulehla, A., 2016. Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Dev. Cell* 39, 286–287.
- Cai, C.-L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.-H., Pfaff, S.L., Chen, J., Evans, S., 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* 5, 877–889.
- Cai, C.-L., Martin, J.C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stallcup, W.B., Denton, C.P., McCulloch, A., Chen, J., Evans, S.M., 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454, 104–108.
- Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., Conway, S.J., Yoder, M.C., Haneline, L.S., Franco, D., Shou, W., 2004. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131, 2219–31.
- Chen, Y., Liu, J., Zheng, Y., Wang, J., Wang, Z., Gu, S., Tan, J., Jing, Q., Yang, H., 2015. Uncoupling protein 3 mediates H(2)O(2) preconditioning-afforded cardioprotection through the inhibition of MPTP opening. *Cardiovasc. Res.* 105, 192–202.
- Cheng, G., Litchenberg, W.H., Cole, G.J., Mikawa, T., Thompson, R.P., Gourdie, R.G., 1999. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development* 126, 5041–5049.
- Christoffels, V.M., Habets, P.E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W.H., Bao, Z.Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R.P., Moorman, A.F., 2000. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev. Biol.* 223, 266–78.
- Christoffels, V.M., Moorman, A.F., 2009. Development of the cardiac conduction system: why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2, 195–207.
- Chung, S., Arrell, D.K., Faustino, R.S., Terzic, A., Dzeja, P.P., 2010. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 725–734.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-terzic, C., Behfar, A., Terzic, A., 2011. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Natl. Institutes Heal.* 4, 1–12.
- Ciria, M., García, N., Ontoria-Oviedo, I., González-King, H., Carrero, R., De La Pompa, J., Montero, J., Sepúlveda, P., 2017. Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α Upstream of Notch and SUMO Pathways. *Stem Cells Dev* [Epub ahead of print].
- Clowes, C., Boylan, M.G.S., Ridge, L.A., Barnes, E., Wright, J.A., Hentges, K.E., 2014. The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development: Cardiac Essential Genes. *genesis* 52, 713–737.
- Coe, N.R., Smith, A.J., Frohnert, B.I., Watkins, P.A., Bernlohr, D.A., 1999. The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 274, 36300–36304.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P., 2003. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 α . *Cardiovasc. Res.* 60, 569–579.
- Datta, K., Mondal, S., Sinha, S., Li, J., Wang, E., Knebelmann, B., Karumanchi, S.A., Mukhopadhyay, D., 2005. Role of elongin-binding domain of von Hippel Lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma. *Oncogene* 24, 7850–8.
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L.K., Betz, I., Tembuysen, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., Decimo, I., Blanco, R., Wyns, S., Vangindertael, J., Rocha, S., Collins, R.T., Munck, S., Daelemans, D., Imamura, H., Devlieger, R., Rider, M., Van Veldhoven, P.P., Schuit, F., Bartrons, R., Hofkens, J., Fraisl, P., Telang, S., Deberardinis, R.J., Schoonjans, L., Vinckier, S., Chesney, J., Gerhardt, H., Dewerchin, M., Carmeliet, P., 2013. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651–663.
- de Boer, B.A., van den Berg, G., de Boer, P.A.J., Moorman, A.F.M., Ruijter, J.M., 2012. Growth of the developing mouse heart: An interactive qualitative and quantitative 3D atlas. *Dev. Biol.* 368, 203–213.
- del Peso, L., Castellanos, M.C., Temes, E., Martín-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., Landazuri, M.O., 2003. The von Hippel Lindau/Hypoxia-inducible Factor (HIF) Pathway Regulates the Transcription of the HIF-Proline Hydroxylase Genes in Response to Low Oxygen. *J. Biol. Chem.* 278, 48690–48695.
- Doe, M.R., Ascano, J.M., Kaur, M., Cole, M.D., 2012. Myc posttranscriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells. *Cancer Res.* 72, 949–957.
- Drake, K.J., Sidorov, V.Y., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H., Wikswo, J.P., 2013. Amino acids as metabolic substrates during cardiac ischemia. *237*, 1–17.
- Dunwoodie, S.L., 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell* 17, 755–773.

- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z., 2009. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., Keating, M.T., 2005. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 19, 1175–87.
- Epstein, A.C.R., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J., 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43–54.
- Feijoo-Cuaresma, M., Mendez, F., Maqueda, A., Esteban, M.A., Naranjo-Suarez, S., Castellanos, M.C., del Cerro, M.H., Vazquez, S.N., Garcia-Pardo, A., Landazuri, M.O., Calzada, M.J., 2008. Inadequate Activation of the GTPase RhoA Contributes to the Lack of Fibronectin Matrix Assembly in von Hippel-Lindau Protein-defective Renal Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 24982–24990.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669–676.
- Ferré, P., Decaux, J.F., Issad, T., Girard, J., 1986. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. développement* 26, 619–31.
- Flink, I.L., Oana, S., Maitra, N., Bahl, J.J., Morkin, E., 1998. Changes in E2F complexes containing retinoblastoma protein family members and increased cyclin-dependent kinase inhibitor activities during terminal differentiation of cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 563–578.
- Foglia, M.J., Poss, K.D., 2016. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development* 143, 729–740.
- Fraser, F., Corstorphine, C.G., Zammit, V.A., 1997. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem. J* 323, 711–718.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C. V., Semenza, G.L., 2007. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* 129, 111–122.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., Lemke, G., 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390–4.
- George Jr., A.L., 2014. Recent genetic discoveries implicating ion channels in human cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 15, 47–52.
- Gibala, M.J., Young, M.E., Taegtmeier, H., 2000. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 168, 657–665.
- Gilde, a J., van der Lee, K. a, Willemsen, P.H., Chinetti, G., Van Der Leij, F.R., van der Vusse, G.J., Staels, B., van Bilsen, M., 2003. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) {alpha} and PPAR {beta} / {delta}, but not PPAR{gamma}, Modulate the Expression of Genes Involved in Cardiac Lipid Metabolism. *Circ. Res.* 92, 518–524.
- Gnarra, J.R., Ward, J.M., Porter, F.D., Wagner, J.R., Devor, D.E., Grinberg, a, Emmert-Buck, M.R., Westphal, H., Klausner, R.D., Linehan, W.M., 1997. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9102–9107.
- Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., Johnson, R.S., 2003. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 23, 359–369.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., Simon, M.C., 2007. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell*.
- Gort, E.H., van Haaften, G., Verlaan, I., Groot, a J., Plasterk, R.H. a, Shvarts, a, Suijkerbuijk, K.P.M., van Laar, T., van der Wall, E., Raman, V., van Diest, P.J., Tijsterman, M., Vooijs, M., 2008. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene* 27, 1501–1510.
- Gould, G.W., Holman, G.D., 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. [Review]. *Biochem J* 295, 329–341.
- Gourdie, R.G., Harris, B.S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K.W., O'Brien, T.X., Thompson, R.P., Sedmera, D., 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 69, 46–57.
- Gourdie, R.G., Mima, T., Thompson, R.P., Mikawa, T., 1995. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* 121, 1423–1431.
- Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolos, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A.N., Zang, H., Mukouyama, Y.S., Chen, H., Shou, W., Ballestar, E., Esteller, M., Rojas, A., Perez-Pomares, J.M., de la Pompa, J.L., 2007. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev. Cell* 12, 415–429.
- Grieskamp, T., Rudat, C., Ludtke, T.H., Norden, J., Kispert, A., n.d. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res* 108, 813–823.
- Guadix, J.A., Ruiz-Villalba, A., Lettice, L., Velecela, V., Muñoz-Chápuli, R., Hastie, N.D., Pérez-Pomares, J.M., Martínez-Estrada, O.M., 2011. Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through

- transcriptional activation of Raldh2. *Development* 138, 1093–1097.
- Guimaraes-Camboa, N., Stowe, J., Aneas, I., Sakabe, N., Cattaneo, P., Henderson, L., Kilberg, M.S., Johnson, R.S., Chen, J., McCulloch, A.D., Nobrega, M.A., Evans, S.M., Zamboni, A.C., 2015. HIF1 α Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes. *Dev. Cell* 33, 507–521.
- Guo, Y., Schoell, M.C., Freeman, R.S., 2009. The von Hippel-Lindau protein sensitizes renal carcinoma cells to apoptotic stimuli through stabilization of BIM(EL). *Oncogene* 28, 1864–74.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Haase, V.H., Glickman, J.N., Socolovsky, M., Jaenisch, R., 2001. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1583–1588.
- Hammer, S., To, K.K., Yoo, Y.G., Koshiji, M., Huang, L.E., 2007. Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. *Cell cycle* 6, 1919–1926.
- Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., Krek, W., 2003. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat. Cell Biol.* 5, 64–70.
- Hertig, C.M., Kubalak, S.W., Wang, Y., Chien, K.R., 1999. Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 37362–37369.
- Hom, J.R., Quintanilla, R.A., Hoffman, D.L., de Mesy Bentley, K.L., Molkentin, J.D., Sheu, S.S., Porter Jr., G.A., 2011. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev. Cell* 21, 469–478.
- Hong, C.S., Graham, N.A., Gu, W., Espindola Camacho, C., Mah, V., Maresh, E.L., Alavi, M., Bagryanova, L., Krotee, P.A.L., Gardner, B.K., Behbahan, I.S., Horvath, S., Chia, D., Mellinghoff, I.K., Hurvitz, S.A., Dubinett, S.M., Critchlow, S.E., Kurdistani, S.K., Goodlick, L., Braas, D., Graeber, T.G., Christofk, H.R., 2016. MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell Rep.* 14, 1590–1601.
- Hoogaars, W.M.H., Tessari, A., Moorman, A.F.M., De Boer, P.A.J., Hagoort, J., Soufan, A.T., Campione, M., Christoffels, V.M., 2004. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc. Res.* 62, 489–499.
- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoigne, A., Hue, L., Proud, C., Rider, M., 2002. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr. Biol.* 12, 1419–1423.
- Hsu, T., 2012. Complex cellular functions of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: insights from model organisms. *Oncogene* 31, 2247–2257.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C., 2003. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9361–9374.
- Huang, D., Li, T., Li, X., Zhang, L., Sun, L., He, X., Zhong, X., Jia, D., Song, L., Semenza, G.L., Gao, P., Zhang, H., 2014. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell Rep.* 8, 1930–1942.
- Huang, Y., Hickey, R.P., Yeh, J.L., Liu, D., Dadak, A., Young, L.H., Johnson, R.S., Giordano, F.J., 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J.* 18, 1138–1140.
- Hütter, J.F., Piper, H.M., Spieckermann, P.G., 1984. Kinetic analysis of myocardial fatty acid oxidation suggesting an albumin receptor mediated uptake process. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16, 219–226.
- Isaacs, J.S., Yun, J.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., Ratcliffe, P.J., Linehan, W.M., Neckers, L., 2005. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8, 143–153.
- Isoe, T., Makino, Y., Mizumoto, K., Sakagami, H., Fujita, Y., Honjo, J., Takiyama, Y., Itoh, H., Haneda, M., 2010. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int.* 78 VN-r, 48–59.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G., 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464–468.
- Iyer, N. V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, a M., Yu, a Y., Semenza, G.L., 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149–162.
- Izquierdo-García, J.L., Rodríguez, I., Kyriazis, A., Villa, P., Barreiro, P., Desco, M., Ruiz-Cabello, J., 2009. A novel R-package graphic user interface for the analysis of metabonomic profiles. *BMC Bioinformatics* 10, 363.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F.,

- Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* (80-.). 292, 468–472.
- Jaffredo, T., Vandenbunder, B., Dieterlen-Lièvre, F., 1989. In situ study of c-myc protein expression during avian development. *Development* 105, 679–695.
- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C., Bradfield, C. a, 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech. Dev.* 73, 117–123.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W., 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709–720.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., Semenza, G.L., 1997. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272, 19253–19260.
- Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y., Batts, L., Baldwin, H.S., Hogan, B.L.M., 2003. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart service An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev.* 17, 2362–2367.
- Jiao, M., Nan, K.J., 2012. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1?? pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 40, 461–468.
- Julia, P., Young, H., Buckberg, G., Kofsky, E., Bugyi, H., 1990. Studies of myocardial protection in the immature heart. II. Evidence for importance of amino acid metabolism in tolerance to ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 100, 888–95.
- Kaelin, W.G., 2007. Von Hippel-Lindau disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2, 145–173.
- Kaelin, W.G., Ratcliffe, P.J., 2008. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Katz, T.C., Singh, M.K., Degenhardt, K., Rivera-Feliciano, J., Johnson, R.L., Epstein, J.A., Tabin, C.J., 2012. Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev. Cell* 22, 639–650.
- Kido, M., Du, L., Sullivan, C.C., Li, X., Deutsch, R., Jamieson, S.W., Thistlethwaite, P.A., 2005. Hypoxia-inducible factor 1- α reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 2116–2124.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C. V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- Kimura, M., Kohno, T., Aizawa, Y., Inohara, T., Shiraishi, Y., Katsumata, Y., Egashira, T., Fukushima, H., Kosaki, K., Fukuda, K., 2016. A Novel SCN5A Mutation Found in a Familial Case of Long QT Syndrome Complicated by Severe Left Ventricular Dysfunction, *Canadian Journal of Cardiology*.
- Kimura, W., Xiao, F., Canseco, D.C., Muralidhar, S., Thet, S., Zhang, H.M., Abderrahman, Y., Chen, R., Garcia, J. a., Shelton, J.M., Richardson, J. a., Ashour, A.M., Asaithamby, A., Liang, H., Xing, C., Lu, Z., Zhang, C.C., Sadek, H. a., 2015. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature* 523, 226–230.
- King, K.L., Okere, I.C., Sharma, N., Dyck, J.R.B., Reszko, A.E., McElfresh, T. a, Kerner, J., Chandler, M.P., Lopaschuk, G.D., Stanley, W.C., 2005. Regulation of cardiac malonyl-CoA content and fatty acid oxidation during increased cardiac power. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1033–H1037.
- Kitajima, S., Takagi, a, Inoue, T., Saga, Y., 2000. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 127, 3215–3226.
- Klimova, T., Chandel, N.S., 2008. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* 15, 660–666.
- Koçak Eker, H., Altunoglu, U., Toksoy, G., Kayserili, H., 2016. Holt-Oram syndrome because of the novel TBX5 mutation c.481A>C. *Clin Dysmorphol* 25, 192–194.
- Kodde, I.F., van der Stok, J., Smolenski, R.T., de Jong, J.W., 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*
- Kolwicz, S.C., Purohit, S., Tian, R., 2013. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.*
- Koonen, D.P.Y., Glatz, J.F.C., Bonen, A., Luiken, J.J.F.P., 2005. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1736, 163–180.
- Krainock, M., Toubat, O., Danopoulos, S., Beckham, A., Warburton, D., Kim, R., 2016. Epicardial Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Heart Development and Disease. *J. Clin. Med.* 5, 27.
- Krishnan, J., Ahuja, P., Bodenmann, S., Knapik, D., Perriard, E., Krek, W., Perriard, J.C., 2008. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1 α for cardiac morphogenesis and function. *Circ Res* 103, 1139–1146.

- Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., Tokarska-Schlattner, M., Aasum, E., Bogdanova, A., Perriard, E., 2009. Activation of a HIF1 α -PPAR γ Axis Underlies the Integration of Glycolytic and Lipid Anabolic Pathways in Pathologic Cardiac Hypertrophy. *Cell Metab.* 9, 512–524.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Chien, K.R., 2008. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 135, 193–205.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C., Hauser, C., 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394–398.
- Lee, Y.M., Jeong, C.H., Koo, S.Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.K., Raleigh, J.A., Chung, H.Y., Yoo, M.A., Kim, K.W., 2001. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn* 220, 175–186.
- Lei, L., Mason, S., Liu, D., Huang, Y., Marks, C., Hickey, R., Jovin, I.S., Pypaert, M., Johnson, R.S., Giordano, F.J., 2008. Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Degeneration, Failure, and Malignant Transformation of the Heart in the Absence of the von Hippel-Lindau Protein. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3790–3803.
- Lemasters, J.J., 2014. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol.*
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323.
- Li, F., Wang, X., Capasso, J.M., Gerdes, A.M., 1996. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1737–1746.
- Li, N., Yi, F., Sundry, C.M., Chen, L., Hilliker, M.L., Donley, D.K., Muldoon, D.B., Li, P.-L., 2007. Expression and actions of HIF prolyl-4-hydroxylase in the rat kidneys. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F207–16.
- Li, P., Cavallero, S., Gu, Y., Chen, T.H.P., Hughes, J., Hassan, a B., Brüning, J.C., Pashmforoush, M., Sucov, H.M., 2011. IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. *Development* 138, 1795–1805.
- Li, Y., Lim, S., Hoffman, D., Aspenstrom, P., Federoff, H.J., Rempe, D.A., 2009. HUMMR, a hypoxia- and HIF-1 α -inducible protein, alters mitochondrial distribution and transport. *J Cell Biol* 185, 1065–1081.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E.M., Wu, G., 2005. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α . *EMBO Rep.* 6, 373–378.
- Lim, J., Lachenmayer, M.L., Wu, S., Liu, W., Kundu, M., Wang, R., Komatsu, M., Oh, Y.J., Zhao, Y., Yue, Z., 2015. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates. *PLoS Genet.* 11, e1004987.
- Lincoln, J., Alfieri, C.M., Yutzey, K.E., 2004. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev. Dyn.* 230, 239–250.
- Liu, J., Bressan, M., Hassel, D., Huiskens, J., Staudt, D., Kikuchi, K., Poss, K.D., Mikawa, T., Stainier, D.Y., 2010. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. *Development* 137, 3867–3875.
- Lopaschuk, G.D., Jaswal, J.S., 2010. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 56, 130–140.
- Lopaschuk, G.D., Spafford, M.A., 1990. Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits. *Am J Physiol* 258, H1274–80.
- Lopez-Barneo, J., Gonzalez-Rodriguez, P., Gao, L., Fernandez-Aguera, M.C., Pardal, R., Ortega-Saenz, P., 2016. OXYGEN SENSING BY THE CAROTID BODY: MECHANISMS AND ROLE IN ADAPTATION TO HYPOXIA. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* ajpcell.00265.2015.
- Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., Sadek, H.A., 2013. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253.
- Mahon, P.C., Hirota, K., Semenza, G.L., 2001. FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675–2686.
- Majmudar, A.J., Wong, W.J., Simon, M.C., 2010. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell* 40, 294–309.
- Malloy, C.R., Sherry, A.D., Jeffrey, F.M., 1990. Analysis of tricarboxylic acid cycle of the heart using ¹³C isotope isomers. *Am. J. Physiol.* 259, H987–95.
- Martin-Puig, S., Fuster, V., Torres, M., 2012. Heart repair: from natural mechanisms of cardiomyocyte production to the design of new cardiac therapies. *Ann N Y Acad Sci* 1254, 71–81.
- Martin-Puig, S., Wang, Z., Chien, K.R., 2008. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2, 320–331.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.
- Meilhac, S.M., Esner, M., Kelly, R.G., Nicolas, J.F., Buckingham, M.E., 2004. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell* 6, 685–698.

- Melchiorre, K., Sutherland, G.R., Watt-Coote, I., Liberati, M., Thilaganathan, B., 2012. Severe myocardial impairment and chamber dysfunction in preterm preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 31, 454–471.
- Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gómez, M.J., Izquierdo-Garcia, J.L., Flores, L., Jiménez-Borreguero, L.J., Aragonés, J., Ruiz-Cabello, J., Torres, M., Martín-Puig, S., 2016. Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation. *Dev. Cell* 39, 724–739.
- Merz, E.A., Brinster, R.L., Brunner, S., Chen, H.Y., 1981. Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 61, 415–418.
- Meyer, D., Birchmeier, C., 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386–390.
- Mikawa, T., Hurtado, R., 2007. Development of the cardiac conduction system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 90–100.
- Mikhaylova, O., Ignacak, M.L., Barankiewicz, T.J., Harbaugh, S. V., Yi, Y., Maxwell, P.H., Schneider, M., Van Geyte, K., Carmeliet, P., Revelo, M.P., Wyder, M., Greis, K.D., Meller, J., Czyzyk-Krzeska, M.F., 2008. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and Egl-9-Type proline hydroxylases regulate the large subunit of RNA polymerase II in response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2701–17.
- Minamishima, Y.A., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R.T., Kaelin Jr., W.G., 2008. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236–3244.
- Miquerol, L., Beyer, S., Kelly, R.G., 2011. Establishment of the mouse ventricular conduction system. *Cardiovasc. Res.*
- Miquerol, L., Langille, B.L., Nagy, A., 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 127, 3941–3946.
- Miquerol, L., Moreno-Rascon, N., Beyer, S., Dupays, L., Meilhac, S.M., Buckingham, M.E., Franco, D., Kelly, R.G., 2010. Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system. *Circ. Res.* 107, 153–161.
- Moorman, A.F., Christoffels, V.M., 2003. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.* 83, 1223–1267.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martín-Puig, S., Sun, Y., Evans, S.M., Laugwitz, K.-L., Chien, K.R., 2006. Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification. *Cell* 127, 1151–1165.
- Mori, A.D., Bruneau, B.G., 2004. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr. Opin. Cardiol.* 19, 211–215.
- Morita, M., Gravel, S.P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., Topisirovic, I., 2015. MTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*.
- Moskowitz, I.P., Kim, J.B., Moore, M.L., Wolf, C.M., Peterson, M.A., Shendure, J., Nobrega, M.A., Yokota, Y., Berul, C., Izumo, S., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2007. A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell* 129, 1365–1376.
- Moskowitz, I.P., Pizard, A., Patel, V. V., Bruneau, B.G., Kim, J.B., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C.I., Seidman, C.E., Seidman, J.G., 2004. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development* 131, 4107–4116.
- Moslehi, J., Minamishima, Y.A., Shi, J., Neuberger, D., Charytan, D.M., Padera, R.F., Signoretti, S., Liao, R., Kaelin Jr., W.G., 2010. Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 122, 1004–1016.
- Munshi, N. V., 2012. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circ. Res.*
- Myllyharju, J., 2013. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol.* 208, 148–165.
- Nagao, K., Taniyama, Y., Kietzmann, T., Doi, T., Komuro, I., Morishita, R., 2008. HIF-1 α signaling upstream of NKX2.5 is required for cardiac development in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 283, 11841–11849.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, a, Goto, Y.I., Nonaka, I., Hayashi, J.I., 2001. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934–940.
- Nakada, Y., Canseco, D.C., Thet, S., Abdisalaam, S., Asaithamby, A., Santos, C.X., Shah, A.M., Zhang, H., Faber, J.E., Kinter, M.T., Szweda, L.I., Xing, C., Hu, Z., Deberardinis, R.J., Schiattarella, G., Hill, J.A., Oz, O., Lu, Z., Zhang, C.C., Kimura, W., Sadek, H.A., 2016. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* 541, 222–227.
- Nakamura, T., Colbert, M.C., Robbins, J., 2006. Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ. Res.* 98, 1547–1554.
- Narravula, S., Colgan, S.P., 2001. Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression During Hypoxia. *J. Immunol.* 166, 7543–7548.
- Neary, M.T., Mohun, T.J., Breckenridge, R.A., 2013. A mouse model to study the link between hypoxia, long QT interval and sudden infant death syndrome. *Dis. Model. Mech.* 6, 503–507.
- Neary, M.T., Ng, K.E., Ludtmann, M.H., Hall, A.R., Piotrowska, I., Ong, S.B., Hausenloy, D.J., Mohun, T.J., Abramov, A.Y., Breckenridge, R.A., 2014. Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J Mol Cell Cardiol* 74, 340–352.

- Niessen, K., Karsan, A., 2007. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *AJP Cell Physiol.* 293, C1–C11.
- O'Rourke, J.F., Tian, Y.M., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., 1999. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor-1?? *J. Biol. Chem.* 274, 2060–2071.
- Ohh, M., Yauch, R.L., Lonergan, K.M., Whaley, J.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Gavin, B.J., Kley, N., Kaelin, W.G., Iliopoulos, O., 1998. The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix. *Mol. Cell* 1, 959–968.
- Olivey, H.E., Compton, L.A., Barnett, J. V., 2004. Coronary vessel development: the epicardium delivers. *Trends Cardiovasc Med* 14, 247–251.
- Olivey, H.E., Svensson, E.C., 2010. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ. Res.*
- Ortiz-Barahona, A., Villar, D., Pescador, N., Amigo, J., del Peso, L., 2010. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res.* 38, 2332–2345.
- Ostadal, B., Ostadalova, I., Dhalla, N.S., 1999. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol. Rev.* 79, 635–659.
- Pagé, E.L., Robitaille, G. a, Pouyssegur, J., Richard, D.E., 2002. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48403–9.
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L., Fong, G.-H., 2000. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2α plays an important role in vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8386–8391.
- Pennisi, D.J., Rentschler, S., Gourdie, R.G., Fishman, G.I., Mikawa, T., 2002. Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int. J. Dev. Biol.*
- Peralta, M., Steed, E., Harlepp, S., González-Rosa, J.M., Monduc, F., Ariza-Cosano, A., Cortés, A., Rayón, T., Gómez-Skarmeta, J.L., Zapata, A., Vermot, J., Mercader, N., 2013. Heartbeat-driven pericardiac fluid forces contribute to epicardium morphogenesis. *Curr. Biol.* 23, 1726–1735.
- Perez-Pomares, J.M., de la Pompa, J.L., 2011. Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circ Res* 109, 1429–1442.
- Pérez-Pomares, J.M., Macías, D., García-Garrido, L., Muñoz-Chápuli, R., 1998. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev. Biol.* 200, 57–68.
- Peshkovsky, C., Totong, R., Yelon, D., 2011. Dependence of cardiac trabeculation on neuregulin signaling and blood flow in zebrafish. *Dev. Dyn.* 240, 446–456.
- Peuhkurinen, K.J., Takala, T.E., Nuutinen, E.M., Hassinen, I.E., 1983. Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* 244, H281–H288.
- Pires-Gomes, A., Pérez-Pomares, J., 2013. The Epicardium and Coronary Artery Formation. *J. Dev. Biol.* 1, 186–202.
- Porras, D., Brown, C.B., 2008. Temporal-spatial ablation of neural crest in the mouse results in cardiovascular defects. *Dev. Dyn.* 237, 153–162.
- Prabhakar, N.R., 2013. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J. Physiol.* 591, 2245–2257.
- Puente, B.N., Kimura, W., Muralidhar, S.A., Moon, J., Amatruda, J.F., Phelps, K.L., Grinsfelder, D., Rothermel, B.A., Chen, R., Garcia, J.A., Santos, C.X., Thet, S., Mori, E., Kinter, M.T., Rindler, P.M., Zacchigna, S., Mukherjee, S., Chen, D.J., Mahmoud, A.I., Giacca, M., Rabinovitch, P.S., Asaithamby, A., Shah, A.M., Szveda, L.I., Sadek, H.A., 2014. The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response. *Cell* 157, 565–579.
- Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677–684.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL <http://>.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., 1963. THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS. *Lancet* 281, 785–789.
- Rankin, E.B., Rha, J., Selak, M. a, Unger, T.L., Keith, B., Liu, Q., Haase, V.H., 2009. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4527–4538.
- Rasband, W., 2015. ImageJ. U. S. Natl. Institutes Heal. Bethesda, Maryland, USA [//imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/).
- Ratajska, A., Czarnowska, E., Cizek, B., 2008. Embryonic development of the proepicardium and coronary vessels. *Int. J. Dev. Biol.*
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., Bedi, A., 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α. *Genes Dev.* 14, 34–44.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I.L., Krasnow, M.A., 2010. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 464, 549–553.

- Richieri, G. V., Anel, a, Kleinfeld, a M., 1993. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32, 7574–7580.
- Risebro, C.A., Riley, P.R., 2006. Formation of the Ventricles. *Sci. World J.* 6, 1862–1880.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–40.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. 1998. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 17, 3005–3015.
- Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., Johnson, R.S., 2000. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 60, 4010–4015.
- Ryan, J.J., Huston, J., Kutty, S., Hatton, N.D., Bowman, L., Tian, L., Herr, J.E., Johri, A.M., Archer, S.L., 2015. Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Can. J. Cardiol.* 31, 391–406.
- Sambandam, N., Lopaschuk, G.D., Brownsey, R.W., Allard, M.F., 2002. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail. Rev.*
- Samsa, L.A., Yang, B., Liu, J., 2013. Embryonic cardiac chamber maturation: Trabeculation, conduction, and cardiomyocyte proliferation: AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART C (SEMINARS IN MEDICAL GENETICS). *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 163, 157–168.
- Sankova, B., Benes, J., Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L., Sedmera, D., 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovasc. Res.* 95, 469–479.
- Santalucia, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A., 1992. Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130, 837–846.
- Scarpulla, R.C., 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*
- Schwartz, R.G., Barrett, E.J., Francis, C.K., Jacob, R., Zaret, B.L., 1985. Regulation of myocardial amino acid balance in the conscious dog. *J. Clin. Invest.* 75, 1204–1211.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R.P., Anderson, R.H., 2000. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec* 258, 319–337.
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Coppen, S.R., Kubalak, S.W., Gourdie, R.G., Thompson, R.P., 2003. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat. Rec.* 274A, 773–777.
- Sedmera, D., Thompson, R.P., 2011. Myocyte proliferation in the developing heart. *Dev Dyn* 240, 1322–1334.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., Gottlieb, E., 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-1 α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.
- Semenza, G.L., 2014. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 39–56.
- Semenza, G.L., Agani, F., Iyer, N., Kotch, L., Laughner, E., Leung, S., Yu, A., 1999. Regulation of Cardiovascular Development and Physiology by Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874, 262–268.
- Shen, H., Cavallero, S., Estrada, K.D., Sandovici, I., Kumar, S.R., Makita, T., Lien, C.-L., Constancia, M., Sucov, H.M., 2015. Extracardiac control of embryonic cardiomyocyte proliferation and ventricular wall expansion. *Cardiovasc. Res.*
- Skulachev, V.P., 2001. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23–29.
- Soonpaa, M.H., Kim, K.K., Pajak, L., Franklin, M., Field, L.J., 1996. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 271, H2183–9.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T., Seed, B., Bustin, S., Walker, N., Schinke-Braun, M., y cols. 2008. A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics* 9, 633.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Seed, B., 2009. PrimerBank: A resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38.
- Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M.L., Brown, D., Olson, E.N., 1997. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* 16, 154–160.
- Stanley, E.G., Biben, C., Elefanty, A., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., Harvey, R.P., 2002. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5. *Int J Dev Biol* 46, 431–439.
- Stanley, W.C., Recchia, F. a, Lopaschuk, G.D., 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 85, 1093–1129.
- Staudt, D.W., Liu, J., Thorn, K.S., Stuurman, N., Liebling, M., Stainier, D.Y.R., 2014. High-resolution imaging of

- cardiomyocyte behavior reveals two distinct steps in ventricular trabeculation. *Development* 141, 585–593.
- Sugden, P.H., 2003. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. pp. 871–886.
- Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C.-L., Chen, J., Evans, S.M., 2007. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev. Biol.* 304, 286–296.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171–1180.
- Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., Watanabe, K., 2002. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: New insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21, 6581–6589.
- Takeda, K., Ho, V.C., Takeda, H., Duan, L.-J., Nagy, A., Fong, G.-H., 2006. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8336–46.
- Tang, N., Mack, F., Haase, V.H., Simon, M.C., Johnson, R.S., 2006. pVHL Function Is Essential for Endothelial Extracellular Matrix Deposition. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2519–2530.
- Tenbaum, S., Arqués, O., Chicote, I., Tenbaum, S., Puig, I., G. Palmer, H., 2012. Standardized Relative Quantification of Immunofluorescence Tissue Staining. *Protoc. Exch.*
- Tian, H., Hammer, R.E., Matsumoto, A.M., Russell, D.W., McKnight, S.L., 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 12, 3320–3324.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–33.
- Varia, M.A., Calkins-Adams, D.P., Rinker, L.H., Kennedy, A.S., Novotny, D.B., Fowler, W.C., Raleigh, J.A., 1998. Pimonidazole: A Novel Hypoxia Marker for Complementary Study of Tumor Hypoxia and Cell Proliferation in Cervical Carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 71, 270–277.
- Veltmann, C., Barajas-Martinez, H., Wolpert, C., Borggreffe, M., Schimpf, R., Pfeiffer, R., Caceres, G., Burashnikov, E., Antzelevitch, C., Hu, D., 2016. Further Insights in the Most Common SCN5A Mutation Causing Overlapping Phenotype of Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Conduction Defect. *J. Am. Heart Assoc.* 5, 1–15.
- Viragh, S., Challice, C.E., 1981. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 201, 157–168.
- von Kodolitsch, Y., Ito, W.D., Franzen, O., Lund, G.K., Koschyk, D.H., Meinertz, T., 2004. Coronary artery anomalies: Part I: Recent insights from molecular embryology. *Z. Kardiol.* 93, 929–937.
- Waldo, K., Miyagawa-Tomita, S., Kumiski, D., Kirby, M.L., 1998. Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure. *Dev. Biol.* 196, 129–144.
- Waldo, K.L., Hutson, M.R., Ward, C.C., Zdanowicz, M., Stadt, H.A., Kumiski, D., Abu-Issa, R., Kirby, M.L., 2005. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Dev Biol* 281, 78–90.
- Walsh, S., Pontén, A., Fleischmann, B.K., Jovinge, S., 2010. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—An analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc. Res.* 86, 365–373.
- Walter, W., Sánchez-Cabo, F., Ricote, M., 2015. GOpot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics* 31, 2912–4.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., Anderson, D.J., 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741–753.
- Wang, X., Hole, D.G., Da Costa, T.H., Evans, R.D., 1998. Alterations in myocardial lipid metabolism during lactation in the rat. *Am. J. Physiol.* 275, E265–E271.
- Wang, X., Proud, C.G., 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21, 362–9.
- Wang, X., Seed, B., 2003. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, e154.
- Warburg, O., 1956. Origin of cancer cells. *Oncol.* 9, 75–83.
- Watanabe, Y., Buckingham, M., 2010. The formation of the embryonic mouse heart: heart fields and myocardial cell lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188, 15–24.
- Wei, H., Bedja, D., Koitabashi, N., Xing, D., Chen, J., Fox-Talbot, K., Rouf, R., Chen, S., Steenbergen, C., Harmon, J.W., Dietz, H.C., Gabrielson, K.L., Kass, D.A., Semenza, G.L., 2012. Endothelial expression of hypoxia-inducible factor 1 protects the murine heart and aorta from pressure overload by suppression of

- TGF- signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E841–E850.
- Wengerhoff, S., Weiss, A., Dwyer, K., Dettman, R., 2010. A migratory role for EphrinB ligands in avian epicardial mesothelial cells. *Dev Dyn* 239, 598–609.
- Wessels, A., Perez-Pomares, J.M., 2004. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276, 43–57.
- Wessels, A., Sedmera, D., 2003. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol. Genomics* 15, 165–176.
- Wu, B., Zhang, Z., Lui, W., Chen, X., Wang, Y., Chamberlain, A.A., Moreno-Rodriguez, R.A., Markwald, R.R., O'Rourke, B.P., Sharp, D.J., Zheng, D., Lenz, J., Baldwin, H.S., Chang, C.-P., Zhou, B., 2012. Endocardial Cells Form the Coronary Arteries by Angiogenesis through Myocardial-Endocardial VEGF Signaling. *Cell* 151, 1083–1096.
- Wu, M., Smith, C.L., Hall, J.A., Lee, I., Luby-Phelps, K., Tallquist, M.D., 2010. Epicardial Spindle Orientation Controls Cell Entry into the Myocardium. *Dev. Cell* 19, 114–125.
- Xiao, L., Koopmann, T.T., ??rd??g, B., Postema, P.G., Verkerk, A.O., Iyer, V., Sampson, K.J., Boink, G.J.J., Mamarbachi, M.A., Varro, A., Jordaens, L., Res, J., Kass, R.S., Wilde, A.A., Bezzina, C.R., Nattel, S., 2013. Unique cardiac Purkinje fiber transient outward current ??-subunit composition: A potential molecular link to idiopathic ventricular fibrillation. *Circ. Res.* 112, 1310–1322.
- Xu, B., Doughman, Y., Turakhia, M., Jiang, W., Landsettle, C.E., Agani, F.H., Semenza, G.L., Watanabe, M., Yang, Y.C., 2007. Partial rescue of defects in Cited2-deficient embryos by HIF-1 α heterozygosity. *Dev. Biol.* 301, 130–140.
- Youle, R.J., van der Blik, A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062–5.
- Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., Kaelin, W.G., 2008. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* 10, 361–369.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., Semenza, G.L., 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C. V, Semenza, G.L., 2007. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11, 407–420.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., Pu, W.T., 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, 109–13.

Imagen de portada

Ampliación de la pared del ventrículo derecho de un corazón embrionario a E12.5 teñido por inmunofluorescencia. Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul, el transportador de glucosa GLUT1 en verde y el marcador de cardiomiocitos Troponina T en rojo.

Imagen: Beatriz Escobar Rodríguez

Imagen de contraportada

Dibujo integrando la reducción en los niveles de HIF1 α (globos), el cambio metabólico de glucolisis (caramelos y gorra azul) a ácidos grasos (zanca de pollo y gorra roja) y la maduración del corazón embrionario (corazones de atrás a adelante).

Diseño: Gonzalo Gancedo Alonso



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA

Fundación **pro**cnic

cnic

